



**PATENT APPLICATION**

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re application of

Docket No: Q78586

Toru MATSUMOTO

Appln. No.: 10/718,729

Group Art Unit: 1645

Confirmation No.: 1837

Examiner: Unknown

Filed: November 24, 2003

For: ENZYME ELECTRODE AND PROCESS FOR MANUFACTURING THE SAME

**SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Submitted herewith are certified copies of the priority documents on which claims to priority was made under 35 U.S.C. § 119. The Examiner is respectfully requested to acknowledge receipt of said priority documents.

Respectfully submitted,

Howard L. Bernstein  
Registration No. 25,665

SUGHRUE MION, PLLC  
Telephone: (202) 293-7060  
Facsimile: (202) 293-7860

WASHINGTON OFFICE

**23373**

CUSTOMER NUMBER

**Enclosures: Japan 2001-223614  
Japan 2001-237180**

Date: March 4, 2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

T. Matsumoto  
10/718, 729  
Filed 11/24/2003  
#78586  
1 of 2

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2001年 7月24日

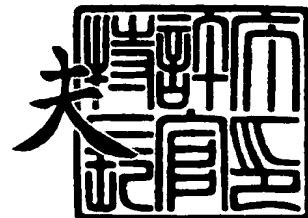
出願番号  
Application Number: 特願2001-223614  
[ST. 10/C]: [JP 2001-223614]

出願人  
Applicant(s): 日本電気株式会社

2004年 1月21日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3001424

【書類名】 特許願

【整理番号】 33703907

【提出日】 平成13年 7月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 27/327

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区芝 5 丁目 7 番 1 号 日本電気株式会社内

【氏名】 松本 達

【特許出願人】

【識別番号】 000004237

【氏名又は名称】 日本電気株式会社

【代理人】

【識別番号】 100110928

【弁理士】

【氏名又は名称】 速水 進治

【電話番号】 0422-23-7415

【選任した代理人】

【識別番号】 100105924

【弁理士】

【氏名又は名称】 森下 賢樹

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 138392

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

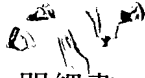
【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0110433

【プルーフの要否】 要



【書類名】 明細書

【発明の名称】 酵素電極およびその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 絶縁基板上に設けられた電極部と、  
該電極部の上部に形成された固定化酵素層と、  
該固定化酵素層の上部に形成された、シラン含有化合物を含む密着層と、  
該密着層の上面に接して形成された、フッ素を含まないビニル系重合体に対し、  
少なくともフルオロアルキレンブロックを含有するペンダント基が結合した構造  
を有するフッ素含有ポリマーを含む制限透過層と、  
を有することを特徴とする酵素電極。

【請求項 2】 前記密着層は、主としてシランカップリング剤により構成された層であることを特徴とする請求項 1 に記載の酵素電極。

【請求項 3】 前記フッ素含有ポリマーは、ポリカルボン酸 (A) のフルオロアルコールエステルであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の酵素電極。

【請求項 4】 前記フッ素含有ポリマーは、ポリカルボン酸 (A) のフルオロアルコールエステルおよびポリカルボン酸 (B) のアルキルアルコールエステルを含むことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の酵素電極。

【請求項 5】 前記ポリカルボン酸 (B) が、ポリメタクリル酸、ポリアクリル酸、または、アクリル酸とメタクリル酸の共重合体であることを特徴とする請求項 4 に記載の酵素電極。

【請求項 6】 前記ポリカルボン酸 (A) が、ポリメタクリル酸、ポリアクリル酸、または、アクリル酸とメタクリル酸の共重合体であることを特徴とする請求項 3 乃至 5 いずれかに記載の酵素電極。

【請求項 7】 前記フッ素含有ポリマーは、アルキルアルコールエステル基およびフルオロアルコールエステル基を有するポリカルボン酸エステル化合物から主としてなることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の酵素電極。

【請求項 8】 請求項 1 乃至 7 いずれかに記載の酵素電極を具備することを特徴とするバイオセンサ。

【請求項 9】 絶縁基板の主面に電極膜を形成した後、該電極膜をパターンニングして複数の電極部を形成する工程と、  
絶縁基板主面に酵素を含む液を塗布した後、絶縁基板を乾燥させて固定化酵素層を形成する工程と、  
絶縁基板主面に、フッ素を含まないビニル系重合体に対し、少なくともフルオロアルキレンブロックを含有するペンダント基が結合した構造を有するフッ素含有ポリマーを含む液を塗布した後、絶縁基板を乾燥させて制限透過層を形成する工程と、  
絶縁基板をダイシングして複数の酵素電極を得る工程と、  
を含むことを特徴とする酵素電極の製造方法。

【請求項 10】 前記酵素を含む液の塗布および前記フッ素含有ポリマー液の塗布を、スピンコート法により行うことを特徴とする請求項 9 に記載の酵素電極の製造方法。

【請求項 11】 前記固定化酵素層を形成する工程の後、絶縁基板主面にシラン含有化合物を含む液を付着した後、絶縁基板を乾燥させて密着層を形成し、次いで該密着層の上面に前記フッ素含有ポリマー液を塗布した後、絶縁基板を乾燥させて前記制限透過層を形成することを特徴とする請求項 9 または 10 に記載の酵素電極の製造方法。

【請求項 12】 前記シラン含有化合物は、シランカップリング剤であることを特徴とする請求項 11 に記載の酵素電極の製造方法。

【請求項 13】 前記フッ素含有ポリマーは、ポリカルボン酸 (A) のフルオロアルコールエステルであることを特徴とする請求項 9 乃至 12 いずれかに記載の酵素電極の製造方法。

【請求項 14】 前記フッ素含有ポリマーは、ポリカルボン酸 (A) のフルオロアルコールエステルおよびポリカルボン酸 (B) のアルキルアルコールエステルを含むことを特徴とする請求項 9 乃至 12 いずれかに記載の酵素電極の製造方法。

【請求項 15】 前記フッ素含有ポリマーは、アルキルアルコールエステル基およびフルオロアルコールエステル基を有するポリカルボン酸エステル化合物

から主としてなることを特徴とする請求項 9 乃至 12 いずれかに記載の酵素電極の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、溶液中の特定の化学物質を、酵素反応を用いて電気化学的に測定する酵素電極およびそれを用いたバイオセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】

生体試料等に含まれる各種成分の測定方法として、酵素反応と電気化学反応を組み合わせた測定方法が広く用いられている。たとえば、溶液中の化学物質を酵素の触媒機能により過酸化水素に変換し、この過酸化水素を酸化還元反応により計測するバイオセンサが汎用化している。たとえばグルコースバイオセンサは、グルコースをグルコースオキシターゼ（GOX）によって酸化し、グルコノラクトンと過酸化水素とする。発生する過酸化水素はグルコース濃度に比例することから、この過酸化水素の発生量を測定することによって試料中のグルコース量を定量する。酵素の触媒機能は、基質濃度に比例して働くが、基質濃度に限界がある。このため、限界濃度以上の基質濃度を測定する場合には、基質量を減らすための制限透過機能を有していた。例えば固定化酵素層の上部に制限透過層を形成する方法が従来利用されていた。

【0003】

そのような制限透過層を形成した例として、米国特許 5,696,314 号には、テフロン粒子等を含む多孔質性の制限透過層を固定化酵素層の上に形成した酵素電極が開示されている。この酵素電極は、図 5 に示すように、基板 30 上に白金等からなる電極 31 が形成され、その上に固定化酵素層 32 が形成されている。そして、その上に接着層 33 を介して固定化酵素層 32 に含まれる酵素と同一の酵素を含む高分子層 34 が形成されている。さらにその上に、制限透過層 35、接着層 36、保護層 37 が形成されている。制限透過層 35 は多孔質性であり、ポリマー粒子、金属粒子、およびポリマーバインダーを必須成分とし、ポリ

マー粒子およびポリマーバインダーの材料としてテフロンを用いた例が開示されている。制限透過層 35 はスクリーン印刷法を用いて形成される。すなわち、まずテフロンバインダーをフッ素含有溶剤に溶解させた後、アルミナ粒子、テフロン粒子等を混合し、これをインクに練り混む (roll milled)。作製したインクをスクリーン印刷 (stenciled) することにより制限透過層 35 が形成される。

#### 【0004】

しかしながら、テフロンのようなフッ素含有量の多いポリマーを制限透過層に用いた場合、固定化酵素層等の隣接する高分子層との密着性に劣ることは前述したとおりである。したがって、制限透過層を固定化酵素層等と一体化して形成したとしても、これらの層の界面の接着力は充分でない。その上、テフロンを用いた制限透過層は柔軟性に欠けるため、隣接する層が膨潤した場合、その膨潤に充分に追随することができない。したがって、使用中に、制限透過層と、固定化酵素層等の隣接層との間で剥離が生じやすいという問題があった。いったん剥離が生じると、制限透過層と電極表面部との間に一定の間隙が生じることとなり、正確な測定が困難になる、洗浄に長時間を要し、再測定時間が長くなる、という問題が生じる。

#### 【0005】

また、上記公報に示されているテフロン等を用いた場合、溶剤に対する溶解性が充分でないため溶液の調整が困難である。このためスピコート法等の技術により層形成することが難しく、制限透過層の薄層化が困難である。くわえて、上記フッ素化合物を用いた制限透過層は多孔質とすることによって制限透過性を発現させるものであるため、膜厚をある程度厚く確保する必要がある。上記米国特許公報には、 $10 \sim 40 \mu\text{m}$ の厚みが好ましいと記載されている。以上のように、制限透過層が厚くせざるを得ないため、応答速度が遅く、また、洗浄に長時間を要するという課題を有していた。

#### 【0006】

さらに、上述のようにテフロンを用いた制限透過層は柔軟性に欠けるため、隣接する層の膨潤により制限透過層が破損しやすく、この点でも改善の余地を有していた。特に、膨潤性の酵素固定化層に隣接して配置した場合、この問題が顕著

となる。

#### 【0007】

このように、上記公報記載の酵素電極は、制限透過層の強度および制限透過層と酵素層との密着力が必ずしも充分ではない。また、テフロンを用いた制限透過層は柔軟性に欠けるため、隣接する層が膨潤した場合、その膨潤に十分に追従することができない。したがって、使用中に、制限透過層と、固定化酵素層等の隣接層との間で剥離が生じやすいという問題があった。いったん剥離が生じると、制限透過層と電極表面部との間に一定の間隙が生じることとなり、(i)正確な測定が困難になる、(ii)洗浄に長時間を要し、再測定時間が長くなる、という問題が生じることがある。

#### 【0008】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明者は、従来技術の有する上記課題を解決すべく、優れた制限透過層の開発に成功し、すでに特許出願している（特開平2000-81409号公報）。同公報開示の酵素電極は、特定構造のポリマーを主成分とする制限透過層を備え、広範囲の使用条件下において測定することが可能であり、長期使用に対して良好な耐久性を示す。

#### 【0009】

その後、本発明者は、上記酵素電極を量産化するための検討を精力的に進めた。その結果、設計した性能を満たす酵素電極を歩留まり良く作製するためには、制限透過層とその下地層（たとえば固定化酵素層）との間の密着性を向上させることが有効であるとの知見が得られた。上記酵素電極は特定構造のポリマーを主成分とする制限透過層を備えているため、テフロン粒子により構成された制限透過層等に比べ、密着性が大幅に改善されている。しかし、たとえば、1枚の基板から大量の酵素電極を作製するプロセスにおいて設計通りの電極構造を歩留まり良く製造するためには、さらなる密着性の改善が重要な技術的課題となる。特開平2000-81409号公報記載の技術によれば、単一チップで作製するプロセスにおいて制限透過層の密着力が充分に得られることが確認されている。しかしながらウエハ単位で複数の電極を作製するプロセスでは、さらに強力な密着性



が望まれる。固定化酵素層や制限透過層などを含む多層膜が表面に形成されたウエハを加工するとき、たとえば、多層膜の形成されたウエハを単一チップに切り分ける工程や、筐体等を実装する工程を実施する際、上記多層膜に大きな負荷が加わるため、これに耐え得る密着性を備えた層構造が望まれる。

#### 【0010】

本発明は、このような状況を鑑みなされたものであって、広範囲の使用条件下において使用でき、長期使用に対する耐久性が良好で、しかも、生産性に優れた酵素電極を提供することを目的とする。

#### 【0011】

また、従来にない高い生産性で高品質の酵素電極を安定的に作製するための技術を提供することを目的とする。

#### 【0012】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明によれば、絶縁基板上に設けられた電極部と、該電極部の上部に形成された固定化酵素層と、該固定化酵素層の上部に形成された、シラン含有化合物を含む密着層と、該密着層の上面に接して形成された、フッ素を含まないビニル系重合体に対し、少なくともフルオロアルキレンブロックを含有するペンダント基が結合した構造を有するフッ素含有ポリマーを含む制限透過層と、を有することを特徴とする酵素電極、が提供される。

#### 【0013】

また、本発明によれば、上記酵素電極を具備するバイオセンサが提供される。

#### 【0014】

上記酵素電極は、固定化酵素層の上部にシラン含有化合物を含む密着層を備え、その上面に接して、フッ素を含まないビニル系重合体に対し、少なくともフルオロアルキレンブロックを含有するペンダント基が結合した構造を有するフッ素含有ポリマーを含む制限透過層が形成されている。このような特定構造のフッ素含有ポリマーと密着層を組み合わせることにより、制限透過層とその下地層（たとえば固定化酵素層）との間の密着性が顕著に向上し、製造安定性に優れた高性能の酵素電極が得られる。このような効果は、フッ素含有ポリマーが上記のよう

な特定構造を有するときに特に顕著となる。シラン含有化合物を含む密着層によって密着性が向上する理由はかならずしも明らかではないが、下地層の表面が改質され、上記特定構造のフッ素含有ポリマーの濡れ性が改善されることによると推察される。たとえば、密着層をシランカップリング剤により構成した場合、シランカップリング剤が下地層表面を覆うことによって表面張力が低下して表面親水性が増し、上記特定構造のフッ素含有ポリマーの濡れ性が向上するものと考えられる。

#### 【0015】

このような密着性改善効果は、制限透過層を構成する特定構造のポリマー材料と、密着層との相乗作用によるものであり、制限透過層としてテフロンのように主骨格中に多くのフッ素を含むポリマーを用いた場合は、本発明の効果は十分に得られない。

#### 【0016】

また、本発明によれば、絶縁基板の主面に電極膜を形成した後、該電極膜をパターンニングして複数の電極部を形成する工程と、絶縁基板主面に酵素を含む液を塗布した後、絶縁基板を乾燥させて固定化酵素層を形成する工程と、絶縁基板主面に、フッ素を含まないビニル系重合体に対し、少なくともフルオロアルキレンブロックを含有するペンダント基が結合した構造を有するフッ素含有ポリマーを含む液を塗布した後、絶縁基板を乾燥させて制限透過層を形成する工程と、絶縁基板をダイシングして複数の酵素電極を得る工程と、を含むことを特徴とする酵素電極の製造方法、が提供される。

#### 【0017】

この製造方法は、複数の酵素電極を一つの基板上に作製するものである。通常、酵素電極を作製する場合、切り出した基板上に固定化酵素層等を形成する方法が採用される。この方法について図19、20を参照して説明する。まず基板に複数の電極部を形成した後、チップ単位で切り出す(図19(a))。スピナー表面に両面テープを貼り(図19(b))、次いで、切り出した電極部を配置したフレキシブル基板をスピナーに取り付ける(図19(c))。電極部に所定の溶液を滴下した後(図20(d))、スピナーを所定の回転数で回転させる(図

20 (e))。得られた酵素電極は、40℃、窒素雰囲気下の窒素ボックスに保管する(図20 (f))。このようなチップごとの製造では、生産効率の向上に限界がある。そこで本発明では、基板上に複数の酵素電極を形成し、これを切り出すという方法を採用するとともに、このような方法によって良好な製造安定性で酵素電極を形成するための手段として、上記特定構造のフッ素含有ポリマーを採用している。かかるフッ素含有ポリマーは、下地層に対する塗布性に優れる上、比較的低粘度の溶液または分散液として調製することができる。このため、たとえばスピコート法により層形成することが可能となり、基板上に複数の酵素電極を好適に形成することができる。

#### 【0018】

上記製造方法において、固定化酵素層を形成する工程の後、絶縁基板主面にシラン含有化合物を含む液を付着した後、絶縁基板を乾燥させて密着層を形成し、次いで該密着層に前記フッ素含有ポリマーを塗布した後、絶縁基板を乾燥させて前記制限透過層を形成することとすれば、制限透過層とその下地となる密着層との間の密着性が一層良好となり、製造安定性が良好となる。前記したように、かかる密着性は、制限透過層を構成する特定構造のポリマー材料と、密着層との相乗作用により得られる。

#### 【0019】

従来の製造方法では、基板をダイシングして複数の酵素電極を得るときや、ボンディングにより配線を行うときに、制限透過層と下地層との間に剥離が発生したり、これらの層の破損が生じることがある。上記製造方法ではシラン含有化合物を用いて密着層を形成するため、このような剥離・破損を有効に防止することができる。

#### 【0020】

##### 【発明の実施の形態】

##### (第1の実施の形態)

#### 【0021】

本発明の第1の実施の形態について図面を参照して説明する。本実施形態の酵素電極は、図1に示すように、絶縁基板1上に作用極として機能する電極2が設

けられ、その上面を被覆するように尿素化合物から主としてなる電極保護層 5 が形成されている。電極保護層 5 は、電極 2 部分にのみ選択的に形成されている。これらの上に  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランから主としてなる結合層 3 が形成され、さらにその上に、有機高分子を母材として酵素を固定化した固定化酵素層 4 が形成され、その上に  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランにより構成された密着層 8 が形成され、そしてその上にポリカルボン酸樹脂のフルオロアルコールエステルを主成分とする制限透過層 6 が順次形成されている。

#### 【0022】

絶縁基板 1 の材料としては、セラミックス、ガラス、石英、プラスチック等の絶縁性の高い材料から主としてなるものを用いることができる。耐水性、耐熱性、耐薬品性および電極との密着性に優れた材料であることが好ましい。

#### 【0023】

電極 2 の材料としては、たとえば白金、金、銀、炭素等を主成分とする材料が用いられ、このうち耐薬品性および過酸化水素の検出特性に優れた白金が好ましく用いられる。絶縁基板 1 上の電極 2 は、スパッタリング法、イオンプレーティング法、真空蒸着法、ケミカル・ベーパー・ディポジッション法、電解法等により形成することができ、このうちスパッタリング法が望ましい。絶縁基板 1 との密着性が良好であり、かつ、白金層を容易に形成できるからである。また、絶縁基板 1 と電極 2 の密着性を改善するために、これらの間にチタン層やクロム層などを挟んでも良い。

#### 【0024】

電極 2 を被覆する電極保護層 5 は、測定試料中に含まれる尿素等の汚染物質の電極への透過を制限する。電極保護層 5 は尿素化合物により構成される。尿素化合物としては尿素、チオ尿素等が挙げられ、このうち毒性が低くさらにコストの安い尿素が好ましく用いられる。但し、これらに限定されるものではない。本発明の酵素電極は、汚染物質を含む電極保護層をあらかじめ電極表面に設けておくことで、使用中の汚染による感度の変動を防止するものである。したがって、このような電極保護層の作用を考慮すれば尿素化合物の種類が上記のものに限定されないことは明らかである。

## 【0025】

電極保護層 5 はたとえば浸漬法、プラズマ重合法、電解法等で形成される。このうち、プロセス時間が短く、安価な装置で実施できる電解法が望ましい。すなわち、支持電解質と尿素化合物を含む混合溶液中に電極を予め形成した絶縁基板を浸漬し、通電することにより、電極保護層を形成することが好ましい。この際、混合溶液中の尿素濃度は、好ましくは 0.1 mM ~ 6.7 M、さらに好ましくは 1 M ~ 6.7 M とする。また、混合溶液中の塩化ナトリウム濃度は、好ましくは 0.1 mM ~ 2 M、さらに好ましくは 1.5 mM ~ 150 mM とする。このようにすることによって良質な電極保護層が得られ、汚染物質の電極への付着を効果的に制限するとともに、干渉物質の透過を制限して良好な選択性を得ることができる。さらに、結合層 3 との密着性も向上する。

## 【0026】

電極保護層 5 上に形成された結合層 3 は、その上の固定化酵素層 4 と、絶縁基板 1 および電極保護層 5 との密着性（結合力）を向上させる。また、絶縁基板 1 の表面の濡れ性を改善し、酵素を固定化した固定化酵素層 4 を形成する際の膜厚の均一性を向上させる効果もある。さらには、電極 2 での過酸化水素の反応に干渉するアスコルビン酸、尿酸およびアセトアミノフェンに対する選択透過性も有する。結合層 3 は、たとえばシランカップリング剤により構成することができる。シランカップリング剤の種類としては、ビニルトリクロルシラン、ビニルトリメトキシシラン、ビニルトリエトキシシラン、 $\beta$ -(3,4エポキシシクロヘキシル)エチルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -グリシドキシプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -グリシドキシプロピルメチルジエトキシシラン、 $\gamma$ -グリシドキシプロピルトリエトキシシラン、 $\gamma$ -メタクリロキシプロピルメチルジメトキシシラン、 $\gamma$ -メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -メタクリロキシプロピルメチルジエトキシシラン、 $\gamma$ -メタクリロキシプロピルトリエトキシシラン、N- $\beta$ （アミノエチル） $\gamma$ -アミノプロピルメチルジメトキシシラン、N- $\beta$ （アミノエチル） $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシラン、N- $\beta$ （アミノエチル） $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン、 $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン、N-フェニル- $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシラン、

$\gamma$ -クロロプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -メルカプトプロピルトリメトキシシラン、3-イソシアネートプロピルトリエトキシシラン、3-アクリロキシプロピルトリメトキシシラン、3-トリエトキシシリル-N-(1,3-ジメチル-ブチリデン)が挙げられるが、このうち、層間結合力、選択透過性の観点から、アミノシランの一種である $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランが好ましく用いられる。結合層3は、例えばシランカップリング剤溶液をスピンコートすることにより形成することができる。この際、シランカップリング剤濃度は、1v/v% (体積%)程度とすることが好ましい。選択透過性が顕著に向上するからである。

#### 【0027】

固定化酵素層4は、有機高分子を母材（バインダー）として、触媒機能をもつ酵素を固定化したものである。固定化酵素層4は、例えば、各種酵素、グルタルアルデヒド等のタンパク質架橋剤、およびアルブミンを含む溶液を、結合層3上に滴下し、スピンコート法にて形成される。アルブミンは、各種酵素を架橋剤の反応から保護するとともにタンパク質の基材となる。酵素としては、乳酸酸化酵素、グルコース酸化酵素、尿酸酸化酵素、ガラクトース酸化酵素、ラクトース酸化酵素、スクロース酸化酵素、エタノール酸化酵素、メタノール酸化酵素、スターチ酸化酵素、アミノ酸酸化酵素、モノアミン酸化酵素、コレステロール酸化酵素、コリン酸化酵素およびピルビン酸酸化酵素等、触媒反応の生成物として過酸化水素を生成する、または酸素を消費する酵素が挙げられる。

#### 【0028】

ここで、2種類以上の酵素を同時に用いて過酸化水素を生成させてもよい。例えば、クレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、およびサルコシンオキシダーゼがこれに該当する。これらの酵素を用いることによってクレアチニンの検出が可能になる。また、酵素と補酵素を同時に用いてもよい。例えば、3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素とニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) がこれに該当する。これらの酵素を用いることによって3-ヒドロキシ酪酸の検出が可能になる。さらに、酵素と電子メディエータを同時に用いてもよい。この場合は、酵素によって還元された電子メディエータが電極表面上で酸化され、このときに得られる酸化電流値を測定する。例えば、グルコースオキシダーゼとフェリシアン化カリウム

がこれに該当する。これらを用いることによってグルコースの検出が可能になる。

#### 【0029】

以上述べたように、固定化酵素層 4 は、少なくとも酵素を含み、測定対象物質を電極感応物質である過酸化水素等に変換する機能を持つ構成であれば、特に限定されない。

#### 【0030】

なお、固定化酵素層 4 の形成方法については、均一な膜厚を形成できる方法であれば特に制限がなく、スピコート法、スプレーコート法、ディップ法などを用いることができるが、このうちスピコート法が好ましい。品質および厚みの均一な制限透過層が安定的に得られるからである。

#### 【0031】

固定化酵素層 4 上に形成された密着層 8 は、固定化酵素層 4 とその上の制限透過層 6 との密着性を向上させる役割を果たす。基板をダイシングして複数の酵素電極を得るときや、ボンディングにより配線を行うとき、制限透過層と下地層との間に剥離が発生したり、これらの層の破損が生じることがある。これに対し本実施形態の酵素電極では、シラン含有化合物を用いて密着層を形成しているため、このような剥離を有効に防止することができる。この結果、特性の揃った酵素電極を安定的に製造することができる。また、制限透過層 6 を形成する際の膜厚の均一性や表面平坦性を向上させる効果もある。さらには、電極 2 での過酸化水素の反応に干渉するアスコルビン酸、尿酸およびアセトアミノフェンに対する選択透過性も良好となる。

#### 【0032】

密着層 8 は、たとえばシランカップリング剤により構成することができる。シランカップリング剤の種類としては、ビニルトリクロルシラン、ビニルトリメトキシシラン、ビニルトリエトキシシラン、 $\beta$ -(3,4エポキシシクロヘキシル)エチルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -グリシドキシプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -グリシドキシプロピルメチルジエトキシシラン、 $\gamma$ -グリシドキシプロピルメチルジメトキシシラン、 $\gamma$ -メタクリロキシプロピルメチルジメトキシシラン、 $\gamma$ -メタク

リロキシプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -メタクリロキシプロピルメチルジエトキシシラン、 $\gamma$ -メタクリロキシプロピルトリエトキシシラン、N- $\beta$  (アミノエチル)  $\gamma$ -アミノプロピルメチルジメトキシシラン、N- $\beta$  (アミノエチル)  $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシラン、N- $\beta$  (アミノエチル)  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン、 $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン、N-フェニル- $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -クロロプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -メルカプトプロピルトリメトキシシラン、3-イソシアネートプロピルトリエトキシシラン、3-アクリロキシプロピルトリメトキシシラン、3-トリエトキシシリル-N- (1, 3-ジメチル-ブチリデン)、が挙げられる。このうち、密着性等の観点から、アミノシラン、特に $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランが好ましく用いられる。また、3-イソシアネートプロピルトリエトキシシラン、3-アクリロキシプロピルトリメトキシシランも効果的である。

#### 【0033】

密着層 8 や結合層 3 におけるカップリング剤液等の塗布方法としては、スピンコート法、スプレー法、ディップ法、加熱気流法等が用いられる。スピンコート法とは、カップリング剤等、結合層の構成材料を溶解または分散させた液をスピナーにより塗布する方法である。この方法によれば膜厚の薄い結合層を膜厚制御性良く形成することができる。また、スプレー法とはカップリング剤等を基板に向けてスプレー噴霧する方法であり、ディップ法とは基板をカップリング剤等に浸漬する方法である。これらの方法によれば、特殊な装置を必要とせず、簡便な工程で結合層を形成することができる。また加熱気流法とは、基板を加熱雰囲気下に設置し、ここにカップリング剤液等の蒸気を流動させる方法である。この方法によっても膜厚の薄い結合層を膜厚制御性良く形成することができる。

#### 【0034】

このうち、シランカップリング剤溶液をスピンコートする方法が好ましく用いられる。優れた密着性が安定的に得られるからである。この際、溶液中のシランカップリング剤濃度は、好ましくは 0.01 ~ 5 v/v%、より好ましくは 0.0



5～1 v/v%とする。シランカップリング剤溶液の溶媒としては、純水；メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール；酢酸エチル等のエステル類等を単独または2種以上を混合して使用できる。このうち、純水で希釈したエタノール、メタノール、および酢酸エチルが好ましい。密着性の向上効果が特に顕著となるからである。なお、密着層8は、選択透過性を顕著に向上させる効果も有する。

#### 【0035】

カップリング剤液等を塗布した後は、乾燥を行う。乾燥温度は特に制限がないが、通常、室温（25℃）～170℃の範囲で行う。乾燥時間は、温度にもよるが、通常は0.5～24時間とする。乾燥は空気中で行っても良いが、窒素等の不活性ガス中で乾燥させてもよい。たとえば、窒素を基板に吹き付けながら乾燥させる窒素ブロー法を用いることもできる。

#### 【0036】

制限透過層6の構成材料としては、フッ素を含まないビニル系重合体に対し、少なくともフルオロアルキレンブロックを含有するペンダント基が結合したポリマーが用いられる。このようなポリマーを用いることにより、下地となる密着層との密着性が顕著に向上する。ここで、「フッ素を含まないビニル系重合体」は、固定化酵素層等の他の有機高分子層との密着性を良好にする役割を有する部分である。ペンダント基を除く重合体部分にフッ素を多量に含むと、固定化酵素層等の他の有機高分子層との密着性が低下し、溶液の調整が困難となり、制限透過層を薄膜として形成することが困難になる。フッ素を含まないビニル系重合体は、炭素－炭素結合からなる主骨格を有する重合体であり、好ましい例としては、不飽和炭化水素、不飽和カルボン酸、および不飽和アルコールからなる群より選ばれた一種以上のモノマーの単独重合体または共重合体が挙げられる。このうち特にポリカルボン酸が好ましい。このような重合体を選択することによって、下地となる密着層との密着性がさらに顕著に向上し、耐久性に優れる制限透過層を得ることができる。また、ビニル系重合体に対し、フルオロアルキレンブロックがエステル基を介して結合していることが好ましい。エステル基は適度な極性を有しているため、密着層で表面を覆われた下地に対し、顕著な密着性を示す。ま

た、フルオロアルキレンブロックを含有するペンダント基とは、フルオロアルキレンを構成単位として含有するペンダント基をいう。フルオロアルキレンとは、アルキレン基の水素の一部または全部をフッ素で置換したものをいう。

### 【0037】

制限透過層6の構成材料は、以上述べたポリマー材料により構成されるが、このうち、ポリカルボン酸のフルオロアルコールエステルが特に好ましい。ポリカルボン酸の例としては、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、アクリル酸とメタクリル酸の共重合体等が挙げられる。ポリカルボン酸のフルオロアルコールエステルとは、ポリカルボン酸の一部、または全部がフルオロアルコールでエステル化されたものをいう。フルオロアルコールとはアルコール中の水素のすべて、または少なくとも一つがフッ素に置換されたものである。ポリカルボン酸のカルボキシル基はすべてがエステル化されていてもよいが、一部がエステル化されていればよい。均一な特性が得られる点で、0.1%以上がエステル化されていることが望ましい。ポリフルオロアルコール中の炭素数は、製膜後に優れた耐久性が得られるC5からC9の範囲が好ましく、製膜し易くなるC8がさらに好ましい。また、ポリフルオロアルコールの級数は耐久性および耐薬品性が最も高くなる一級がよい。ポリカルボン酸のフルオロアルコールエステルのうち特に好ましいのは、ポリメタクリル酸1H、1H-パーフルオロオクチルおよびポリアクリル酸1H、1H、2H、2H-パーフルオロデシルである。優れた制限透過性が安定して得られる上、製膜し易く、酸アルカリおよび各種有機溶媒に対する耐性が高いからである。

### 【0038】

制限透過層の構成材料として、ポリカルボン酸のアルキルアルコールエステルを導入してもよい。たとえば、制限透過層を、ポリカルボン酸(A)のフルオロアルコールエステルと、ポリカルボン酸(B)のアルキルアルコールエステルとを含む構成とすることができ、また、制限透過層を、アルキルアルコールエステル基およびフルオロアルコールエステル基を有するポリカルボン酸エステル化合物から主としてなる構成とすることもできる。なお、ポリカルボン酸(A)とポリカルボン酸(B)は、同種のものであっても異種のものであってもよい。また

、「主としてなる」とは、上記ポリマーが制限透過層を構成する主成分となっていることをいい、たとえば、制限透過層に対する上記ポリマーの含有率が50重量%以上であることをいう。制限透過層を上記のような構成とすると、高温安定性の良好な酵素電極が得られる。なお、制限透過層を構成するポリマーの分子量は、好ましくは1000～50000、さらに好ましくは3000～30000とする。分子量が大きすぎると溶液の調整が困難となり、制限透過層の薄層化が困難となることがある。分子量が小さすぎると十分な制限透過性が得られない場合がある。なお、ここでいう分子量とは数平均分子量をいい、GPC (Gel Permeation Chromatography) により測定することができる。

#### 【0039】

制限透過層6は、上述したポリマーの溶液をスピンコート法により塗布することにより形成される。たとえばパーフルオロヘキサン等のパーフルオロカーボンの溶媒で希釈したポリメタクリル酸のポリフルオロアルコールエステル溶液を、触媒機能をもつ酵素を固定化した固定化酵素層4上に滴下してスピンコート法により形成することができる。この際、溶液中の濃度は、測定対象物質にもよるが、好ましくは0.1～5重量%、さらに好ましくは0.3重量%程度とする。この範囲とすることにより良好な制限透過性が発現するからである。なお制限透過層6の形成方法については、均一な厚さの層が得られる方法であれば制限がなく、スピンコート法、スプレーコート法、ディップ法などを用いることができるが、このうちスピンコート法が好ましい。品質および厚みの均一な制限透過層が安定的に得られるからである。なお、制限透過層の好ましい厚みは、好ましくは0.01～3  $\mu\text{m}$ 、さらに好ましくは0.01～1  $\mu\text{m}$ である。このような厚みとすることで、応答速度の向上および洗浄時間の短縮化を図ることができる。

#### 【0040】

上述した特有の構造を有するポリマーからなる制限透過層6を設けることにより、タンパク質や尿素化合物等の汚染物質の付着が抑制される。このため、電極保護層5による汚染物質の付着抑制効果との相乗効果が得られ、長期使用した場合にも安定した出力特性が得られるという効果が得られる。また、良好な制限透過性が得られ、測定濃度範囲を大幅に拡大できるという効果も得られる。さらに、

制限透過層 6 と密着層 8 との密着性が高いため、溶液中の測定対象物を長期間安定して測定することが可能となる。また、製造過程における多層構造の損傷が少なく、高い生産性が得られる。

#### 【0041】

本実施形態のセンサをグルコースセンサとして使用する場合、最外層の制限透過層 6 がグルコースの拡散速度を制限し、グルコース酸化酵素を使用した固定化酵素層 4 が拡散してきたグルコースと酸素で触媒反応して過酸化水素とグルコノラクトンを発生し、このうち過酸化水素が電極 2 に到達した際の酸化電流を測定してグルコースの濃度を知ることが出来る。また、測定時の電極系は、2 極法の場合には外部から既存の参照極を使用し、3 極法の場合は対極、参照極の両方を測定溶液中に同時に浸漬する。

#### 【0042】

(第 2 の実施形態)

#### 【0043】

本実施形態の酵素電極は、図 2 に示すように、絶縁基板 1 上に作用極として機能する電極 2 が設けられ、その上面を被覆するように尿素化合物から主としてなる電極保護層 5 が形成されている。これらの上に  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランから主としてなる結合層 3 が形成され、その上に、パーフルオロカーボンスルホン酸樹脂からなるイオン交換樹脂層 7、その上に有機高分子を母材として酵素を固定化した固定化酵素層 4、その上に  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランにより構成された密着層 8、そしてその上に、その上にポリカルボン酸樹脂のフルオロアルコールエステルを主成分とする制限透過層 6 が順次形成されている。

#### 【0044】

絶縁基板 1 上に形成する電極 2、電極保護層 5、結合層 3、固定化酵素層 4、密着層 8 および制限透過層 6 は、第 1 の実施の形態と同様の方法により順次形成される。

#### 【0045】

イオン交換樹脂層 7 を構成するパーフルオロカーボンスルホン酸樹脂としては

、たとえばナフィオン（商品名）を用いることができる。ナフィオンとは、陽イオン交換樹脂であり、パーフルオロメチレン主鎖に、末端スルホン酸基を有するパーフルオロポリアルキレンエーテル側鎖を結合させた構造を有している。

#### 【0046】

ナフィオン膜等のイオン交換樹脂層 7 を固定化酵素層 4 の下部に配置することにより、干渉物質の影響を排除することができる。このため、結合層 3 および密着層 8、電極保護層 3 による干渉物質の透過抑制効果との相乗効果が得られ、干渉物質の影響を著しく小さくすることができる。

#### 【0047】

イオン交換樹脂層 7 は、純水で 50% に希釈したエタノールに溶解させて調製したナフィオンを  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン層 3 上に滴下し、スピコート法で形成される。溶媒としては、たとえばイソプロピルアルコール、エチルアルコール等のアルコールが用いられる。滴下するナフィオンの濃度は、好ましくは 1~10 w/v%、さらに好ましくは 5~7 w/v% とする。このような範囲とすることにより、干渉物質の影響を排除する効果が顕著となる。

#### 【0048】

（第 3 の実施形態）

#### 【0049】

酵素電極の製造方法について図 3 および図 4 を参照して説明する。本実施形態では、まず、絶縁材料からなるウエハ 12 上に電極膜を形成した後、パターンニングして作用極 9、対極 10 および参照極 11 を、それぞれ複数、形成する。この状態を図 3 に示す。次いで、ウエハ 12 上に酵素を含む液をスピコート法等により塗布した後、ウエハ 12 を乾燥させて固定化酵素層を形成する。

#### 【0050】

次に、固定化酵素層上にシラン含有化合物を含む液を付着した後、ウエハ 12 を乾燥させて密着層を形成する。

#### 【0051】

次いでこの密着層にフッ素含有ポリマー液を塗布した後、ウエハ 12 を乾燥させて制限透過層を形成する。フッ素含有ポリマーとして前記した制限透過層の構

成材料、たとえばポリカルボン酸のフルオロアルコールエステル類を用いると、品質および厚みの均一な薄層の制限透過層を安定的に形成できる。また、このような材料を用いた場合、溶液粘度を低く抑えることができるので、スピンコート法により薄い制限透過層を安定的に形成できる。

#### 【0052】

その後、ウエハ12をダイシングして複数の酵素電極を得る。酵素電極は、作用極9、対極10および参照極が図4に示すように配置された構造を有する。作用極9及び対極10は、第1および第2の実施形態で述べた電極2と同様のものであればよい。参照極11の材料は銀／塩化銀が好ましく用いられる。

#### 【0053】

このような構成とすると、作用極、対極、参照極が一つの絶縁基板上に形成されるためセンサを駆動しながら溶液を交換することが可能になる。センサ表面が電解質等で濡れている限り、作用極、対極および参照極の電極間は電氣的に接続されることから、センサが一時的に空気に触れても計測が継続できるからである。また、3極法による正確な電気化学測定が可能になり、特に微小な電流検出型の酵素電極を実現することが可能になる。

#### 【0054】

(第4の実施形態)

#### 【0055】

本発明に係る酵素電極を具備するバイオセンサの構造を図6に示す。このセンサは、絶縁基板1上に作用極17、対極18および参照極19が配置され、さらに、温度センサ15が設けられている。作用極17、対極18および参照極19の表面は、それぞれ図1に示した層構造の多層膜で覆われている。

#### 【0056】

本実施形態では作用極は一種類であるが、異なる固定化酵素層を形成した複数の作用極を設けた構成とすることもできる。また、温度センサ以外に、pHセンサ等を設けた構成とすることもできる。また、作用極17、対極18および参照極19は、任意の配置とすることができる。また、本実施形態では作用極、対極、参照極の3極からなるバイオセンサについて説明したが、白金からなる作用極

と参照極を石英基板上に設けた構成としてもよい。

#### 【0057】

また、本実施形態ではアンペロメトリックタイプのセンサの例を示したが、本発明の酵素電極は、イオン感受性電界効果型トランジスタタイプのセンサにも適用できることはいうまでもない。

#### 【0058】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明する。なお、実施例で用いたポリメタクリル酸1H、1H-パーフルオロオクチルは、住友スリーエム社製のフロラードFC-722であり、平均分子量Mnは6000～8000程度（GPC測定値）である。

#### 【0059】

##### （実施例1）

#### 【0060】

まず、日本電気硝子（株）社製の4インチの石英ウエハ（厚さ0.515 mm）に、白金からなる作用極（面積5 mm<sup>2</sup>）と対極（面積5 mm<sup>2</sup>）、銀／塩化銀からなる参照極（面積1 mm<sup>2</sup>）を一組とした82組の電極チップを図3に示すように製作した。一組に切り分けたとき電極チップサイズは10 mm×6 mmである。次にこれを150 mMの塩化ナトリウムを含む6 M尿素溶液中に浸漬し、参照極に対し作用極に0.7 V、10分間印加した。実際には図3に示すように、作用極はすべて結線され、円周につながっている。従って、円周部分と参照極を電気化学測定装置に接続し、電位を印加した。このようにして作用極上に尿素層を形成した。

#### 【0061】

つづいて1 v/v%のγ-アミノプロピルトリエトキシシラン（以下、適宜「APTES」と称する。）水溶液をスピンコートして結合層を形成した。次に、グルコース酸化酵素を含み、かつ1 v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5 w/v%アルブミン溶液をスピンコートして、固定化酵素層を形成した。次に、0.1 v/v%のγ-アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液をスピンコートして密着層を形

成した。さらにその後、パーフルオロヘキサンを用いて0.3重量%に調整したポリメタクリル酸1H, 1H-パーフルオロオクチル溶液を順次スピコートしてポリメタクリル酸1H, 1H-パーフルオロオクチルからなる制限透過層を形成し、酵素電極ウエハを作製した。

#### 【0062】

最後にガラススクライブ装置でウエハをダイシングし、酵素電極を得た。このうち任意の3個を選択し、それぞれフレキシブル基板とワイヤーボンディングで結線した後、防水処理を施した。

#### 【0063】

比較として、固定化酵素層と制限透過層との間に密着層を形成しなかったこと以外は上記と同様にして酵素電極ウエハを作製した。そして、任意の3個を選択し、それぞれフレキシブル基板とワイヤーボンディングで結線した後、防水処理を施した。

#### 【0064】

以上のようにして製作した酵素電極を、150mMの塩化ナトリウムを含むpH7のTES（エヌ・トリス（ヒドロキシメチル）・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド）緩衝液中に浸漬して保存し、この緩衝液を含む200mg/dlグルコース溶液に対するセンサ出力である電流値を0、1、3、9、27日目に測定し、得られるセンサ出力の安定性を評価した。保存温度は24℃として、保存中は電位を印加しなかった。

#### 【0065】

その結果、固定化酵素層と制限透過層との間に密着層の無い酵素電極のセンサ出力を図7、固定化酵素層と制限透過層との間に密着層を設けた酵素電極のセンサ出力を図8に示す。固定化酵素層と制限透過層との間に密着層を形成することによって、長期間に渡って安定したセンサ出力が実現され、また、センサ出力値のばらつきも低減されることが確認された。

#### 【0066】

（実施例2）

#### 【0067】



まず、日本電気硝子（株）社製の 4 インチの石英ウエハ（厚さ 0.515 mm）に、白金からなる作用極（面積  $5\text{ mm}^2$ ）と対極（面積  $5\text{ mm}^2$ ）、銀／塩化銀からなる参照極（面積  $1\text{ mm}^2$ ）を一組とした 82 組の電極チップを図 3 に示すように製作した。一組に切り分けたとき電極チップサイズは  $10\text{ mm} \times 6\text{ mm}$  である。次にこれを  $150\text{ mM}$  の塩化ナトリウムを含む  $6\text{ M}$  尿素溶液中に浸漬し、参照極に対し作用極に  $0.7\text{ V}$ 、 $10$  分間印加した。実際には図 3 に示すように、作用極はすべて結線され、円周につながっている。従って、円周部分と参照極を電気化学測定装置に接続し、電位を印加した。このようにして作用極上に尿素層を形成した。

#### 【0068】

つづいて  $1\text{ v/v\%}$  の  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液をスピンコートして結合層を形成した。次に、 $5\text{ w/v\%}$  のパーフルオロカーボンスルホン酸樹脂溶液をスピンコートしてパーフルオロカーボンスルホン酸樹脂（ナフィオン）を主成分とするイオン交換樹脂層を形成した。次に、グルコース酸化酵素を含み、かつ  $1\text{ v/v\%}$  のグルタルアルデヒドを含む  $22.5\text{ w/v\%}$  アルブミン溶液をスピンコートして、固定化酵素層を形成した。次に、 $0.1\text{ v/v\%}$  の  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液をスピンコートして密着層を形成した。さらにその後、パーフルオロヘキサンをを用いて  $0.3$  重量％に調整したポリメタクリル酸 1H, 1H-パーフルオロオクチル溶液を順次スピンコートしてポリメタクリル酸 1H, 1H-パーフルオロオクチルからなる制限透過層を形成し、酵素電極ウエハを作製した。

#### 【0069】

最後にガラススクライブ装置でウエハをダイシングし、酵素電極を得た。このうち任意の 20 個を選択し、それぞれフレキシブル基板とワイヤーボンディングで結線した後、防水処理を施した。

#### 【0070】

比較として、固定化酵素層と制限透過層との間に密着層を形成しなかったこと以外は上記と同様にして酵素電極ウエハを作製した。そして、任意の 20 個を選択し、それぞれフレキシブル基板とワイヤーボンディングで結線した後、防水処理を施した。

## 【0071】

以上のようにして製作した酵素電極を、150 mMの塩化ナトリウムを含む pH 7 の T E S (エヌ・トリス (ハイドロキシメチル)・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド) 緩衝液中に浸漬して保存し、この緩衝液を含む 200 mg/dl アスコルビン酸溶液に対するセンサ出力である電流値を測定し、得られるセンサ出力の安定性を評価した。

## 【0072】

その結果、固定化酵素層と制限透過層との間に密着層の無い酵素電極のセンサ出力を 100% ととして、固定化酵素層と制限透過層との間に密着層のある酵素電極のセンサ出力を相対値で示した結果を図 9 に示す。それぞれのセンサ出力は 20 個の固定化酵素層と制限透過層との間に密着層を形成することによって、干渉物質であるアスコルビン酸の影響を 1/10 に低下させることができることがわかった。

## 【0073】

(実施例 4)

## 【0074】

まず、日本電気硝子 (株) 社製の 4 インチの石英ウエハ (厚さ 0.515 mm) に、白金からなる作用極 (面積  $5 \text{ mm}^2$ ) と対極 (面積  $5 \text{ mm}^2$ )、銀/塩化銀からなる参照極 (面積  $1 \text{ mm}^2$ ) を一組とした 82 組の電極チップを図 3 に示すように製作した。一組に切り分けたとき電極チップサイズは  $10 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$  である。次にこれを 150 mM の塩化ナトリウムを含む 6 M 尿素溶液中に浸漬し、参照極に対し作用極に 0.7 V、10 分間印加した。実際には図 3 に示すように、作用極はすべて結線され、円周につながっている。従って、円周部分と参照極を電気化学測定装置に接続し、電位を印加した。このようにして作用極上に尿素層を形成した。

## 【0075】

つづいて 1 v/v% の  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液をスピンコートして結合層を形成した。次に、5 w/v% のパーフルオロカーボンスルホン酸樹脂溶液をスピンコートしてパーフルオロカーボンスルホン酸樹脂 (ナフィオン) を

主成分とするイオン交換樹脂層を形成した。次に、グルコース酸化酵素を含み、かつ 1 v/v% のグルタルアルデヒドを含む 2.5 w/v% アルブミン溶液をスピコートして、固定化酵素層を形成した。次に、0.1 v/v% の  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液をスピコートして密着層を形成した。さらにその後、パーフルオロヘキサンを用いて 0.3 重量% に調整したポリメタクリル酸 1H, 1H-パーフルオロオクチル溶液を順次スピコートしてポリメタクリル酸 1H, 1H-パーフルオロオクチルからなる制限透過層を形成し、酵素電極ウエハを作製した。

#### 【0076】

最後にガラススクライブ装置でウエハをダイシングし、酵素電極を得た。このうち任意の 1 個を選択し、それぞれフレキシブル基板とワイヤーボンディングで結線した後、防水処理を施した。

#### 【0077】

比較として、固定化酵素層と制限透過層との間に密着層を形成しなかったこと以外は上記と同様にして酵素電極ウエハを作製した。そして、任意の 1 個を選択し、それぞれフレキシブル基板とワイヤーボンディングで結線した後、防水処理を施した。

以上のようにして製作した 2 種類の酵素電極を、150 mM の塩化ナトリウムを含む pH 7 の TES (エヌ・トリス (ハイドロキシメチル)・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド) 緩衝液中に浸漬して保存し、約 20 mg/dl のグルコースを含むバイオラッド (株) 社製の定量用尿コントロール正常 (ライフチェック) を 10 回連続して測定した。表 1 に 2 種の酵素電極の繰り返し再現性を算出した。

#### 【0078】

【表 1】

繰り返し再現性	
密着層あり	2.5%
密着層なし	3.1%

## 【0079】

その結果、固定化酵素層と制限透過層との間に密着層の有る酵素電極の繰り返し再現性は、2.5%を示したのに対して、固定化酵素層と制限透過層との間に密着層の無い酵素電極の繰り返し再現性は3.1%であり、測定精度は酵素層と制限透過層との間に密着層を備えた酵素電極が優れていることが示された。

## 【0080】

(実施例5)

## 【0081】

まず、日本電気硝子(株)社製の4インチの石英ウエハ(厚さ0.515 mm)に、白金からなる作用極(面積5 mm<sup>2</sup>)と対極(面積5 mm<sup>2</sup>)、銀/塩化銀からなる参照極(面積1 mm<sup>2</sup>)を一組とした82組の電極チップを図3に示すように製作した。一組に切り分けたとき電極チップサイズは10 mm×6 mmである。次にこれを150 mMの塩化ナトリウムを含む6 M尿素溶液中に浸漬し、参照極に対し作用極に0.7 V、10分間印加した。実際には図3に示すように、作用極はすべて結線され、円周につながっている。従って、円周部分と参照極を電気化学測定装置に接続し、電位を印加した。このようにして作用極上に尿素層を形成した。

## 【0082】

つづいて1 v/v%の $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液をスピンコートして結合層を形成した。次に、5 w/v%のパーフルオロカーボンスルホン酸樹脂溶液をスピンコートしてパーフルオロカーボンスルホン酸樹脂(ナフィオン)を主成分とするイオン交換樹脂層を形成した。次に、グルコース酸化酵素を含み、かつ1 v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5 w/v%アルブミン溶液をスピンコートして、固定化酵素層を形成した。次に、0.1 v/v%の $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液をスピンコートして密着層を形成した。

## 【0083】

さらにその後、パーフルオロヘキサンをを用いて0.3重量%に調整したポリメタクリル酸1H, 1H-パーフルオロオクチル溶液、同濃度のポリアクリル酸1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロデシル溶液、同濃度のメタクリル酸1H, 1H-パーフルオロオクチ

ルとメタクリル酸シクロヘキシルの共重合体溶液、同濃度のアクリル酸1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロデシルとメタクリル酸シクロヘキシルの共重合体溶液をそれぞれスピンコートしてそれぞれの制限透過層を形成し、酵素電極ウエハを作製した。

#### 【0084】

最後にガラススクライブ装置でウエハをダイシングし、酵素電極を得た。このうち任意の1個を選択し、それぞれフレキシブル基板とワイヤーボンディングで結線した後、防水処理を施した。

#### 【0085】

以上のようにして製作した4種類の酵素電極を、150 mMの塩化ナトリウムを含むpH 7のTES (エヌ・トリス (ハイドロキシメチル)・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド) 緩衝液中に浸漬して保存し、30サンプルの糖尿病患者尿を測定し、既存の臨床検査装置 (日立 (株) 製自動分析装置7050、グルコースデヒドロゲナーゼ法) と比較し、相関係数を算出した。

その結果、表2に示すように、どの条件で製作した酵素電極も既存の臨床検査装置と高い相関を示すことが示された。

#### 【0086】

【表2】

	回帰式	相関係数
ポリメタクリル酸1H, 1H-パーフルオロオクチル	$Y = 1.0x + 10$	$R = 0.998$
ポリアクリル酸1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロデシル	$Y = 1.1x + 8$	$R = 0.988$
ポリメタクリル酸1H, 1H-パーフルオロオクチルと ポリメタクリル酸シクロヘキシルの共重合体	$Y = 1.0x + 5$	$R = 0.992$
ポリアクリル酸1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロデシルと ポリメタクリル酸シクロヘキシルの共重合体	$Y = 1.0x + 4$	$R = 0.995$

#### 【0087】

##### 実施例 6

#### 【0088】

まず、日本電気硝子 (株) 社製の4インチの石英ウエハ (厚さ0.515 mm) に、白金からなる作用極 (面積  $5 \text{ mm}^2$ ) と対極 (面積  $5 \text{ mm}^2$ )、銀/塩化銀からなる参照極 (面積  $1 \text{ mm}^2$ ) を一組とした82組の電極チップを図3に示すように製作した。一組に切り分けたとき電極チップサイズは  $10 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$  である。次にこれ

を 150 mM の塩化ナトリウムを含む 6 M 尿素溶液中に浸漬し、参照極に対し作用極に 0.7 V、10 分間印加した。実際には図 3 に示すように、作用極はすべて結線され、円周につながっている。従って、円周部分と参照極を電気化学測定装置に接続し、電位を印加した。このようにして作用極上に尿素層を形成した。

#### 【0089】

つづいて 1 v/v%  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液をスピンコートし、40℃の窒素雰囲気下で 1 時間乾燥させ、結合層を形成した。

#### 【0090】

次に、5 % のナフィオン溶液をスピンコートし 40℃ の窒素雰囲気下で 1 時間乾燥させ、そしてグルコース酸化酵素を含み、かつ 1 v/v% のグルタルアルデヒドを含む 22.5 w/v% アルブミン溶液をスピンコートして、固定化酵素層を形成した。

#### 【0091】

次に溶媒に純水を用いて 0.05、0.1、および 0.2 v/v% に調整した、3 種類の  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液をそれぞれスピンコートし、40℃ の窒素雰囲気下で 1 時間乾燥させて密着層を形成した。コントロールとして、密着層を形成していないものも製作した。

#### 【0092】

その後、パーフルオロヘキサンを用いて 0.3 重量% に調整したポリメタクリル酸 1H, 1H-パーフルオロオクチル溶液を順次スピンコートしてポリメタクリル酸 1H, 1H-パーフルオロオクチルからなる制限透過層を形成し、酵素電極ウエハを製作した。

#### 【0093】

最後にガラススクライプ装置でウエハをダイシングし、酵素電極を得た。このうち任意の 5 個を選択し、それぞれフレキシブル基板とワイヤーボンディングで結線した後、防水処理を施した。

#### 【0094】

以上のようにして製作した酵素電極を、150 mM の塩化ナトリウムを含む pH 7 の TES (エヌ・トリス (ハイドロキシメチル)・メチル・2-アミノエタ

ンサルフォニックアシッド) 緩衝液中に浸漬して保存し、この緩衝液を含む 0 から 2000 mg/dl グルコース溶液に対するセンサ出力である電流値を測定し検量線を作成した。また、この検量線に対応する平均値と標準偏差を算出した。固定化酵素層と制限透過層との間に密着層の無い酵素電極 (コントロール) の測定結果を図 10、固定化酵素層と制限透過層との間に密着層のある酵素電極の測定結果を図 11 から図 13 に示す。図 11、12、13 は、それぞれ 0.05、0.1、および 0.2 v/v% に調整した  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液に対応する。図中、分図 (a) が検量線を示し、分図 (b) の棒グラフが平均値、エラーバーが標準偏差を示す。固定化酵素層と制限透過層との間に密着層を形成することによって、ばらつきの低い、すなわち特性の揃った、直線性の高い検量線を持つ酵素電極の作製が可能であることがわかった。特に、0.1 v/v%  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランが最適であることがわかった。

#### 【0095】

##### 実施例 7

#### 【0096】

まず、日本電気硝子 (株) 社製の 4 インチの石英ウエハ (厚さ 0.515 mm) に、白金からなる作用極 (面積 5 mm<sup>2</sup>) と対極 (面積 5 mm<sup>2</sup>)、銀/塩化銀からなる参照極 (面積 1 mm<sup>2</sup>) を一組とした 82 組の電極チップを図 3 に示すように製作した。一組に切り分けたとき電極チップサイズは 10 mm × 6 mm である。次にこれを 150 mM の塩化ナトリウムを含む 6 M 尿素溶液中に浸漬し、参照極に対し作用極に 0.7 V、10 分間印加した。実際には図 3 に示すように、作用極はすべて結線され、円周につながっている。従って、円周部分と参照極を電気化学測定装置に接続し、電位を印加した。このようにして作用極上に尿素層を形成した。

#### 【0097】

つづいて 1 v/v%  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液をスピンコートし、40℃の窒素雰囲気下で 1 時間乾燥させ、結合層を形成した。

#### 【0098】

次に、5 % のナフィオン溶液をスピンコートし 40℃の窒素雰囲気下で 1 時間乾

乾燥させ、そしてグルコース酸化酵素を含み、かつ1 v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5 w/v%アルブミン溶液をスピンコートして、固定化酵素層を形成した。

#### 【0099】

次に溶媒として純水で0.1 v/v%に調整した $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液に終濃度として3、5、7 v/v%のエタノールを添加した溶液をそれぞれスピンコートし、40℃の窒素雰囲気下で1時間乾燥させて密着層を形成した。

#### 【0100】

その後、パーフルオロヘキサンを用いて0.3重量%に調整したポリメタクリル酸1H, 1H-パーフルオロオクチル溶液を順次スピンコートしてポリメタクリル酸1H, 1H-パーフルオロオクチルからなる制限透過層を形成し、酵素電極ウエハを製作した。

#### 【0101】

最後にガラススクライブ装置でウエハをダイシングし、酵素電極を得た。このうち任意の5個を選択し、それぞれフレキシブル基板とワイヤーボンディングで結線した後、防水処理を施した。

#### 【0102】

以上のようにして製作した酵素電極を、150 mMの塩化ナトリウムを含むpH 7のTES（エヌ・トリス（ヒドロキシメチル）・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド）緩衝液中に浸漬して保存し、この緩衝液を含む0から2000 mg/dl グルコース溶液に対するセンサ出力である電流値を測定し検量線を作成した。また、この検量線に対応する平均値と標準偏差を算出した。測定結果を図14から図16に示す。図14、15、16は、それぞれ3、5、7 v/v%のエタノール添加溶液に対応する。図中、分図（a）が検量線を示し、分図（b）の棒グラフが平均値、エラーバーが標準偏差を示す。溶媒にエタノールを添加することによって、グルコースに対する電流値が増加し、低濃度のグルコースに対しても十分な電流値が得られることがわかった。本実施例の酵素電極を用いれば、低濃度のグルコースに対しても正確に測定できる。添加するエタノ



ール濃度は、5 v/v%で十分であることがわかった。

### 【0103】

#### 実施例 8

### 【0104】

まず、日本電気硝子（株）社製の4インチの石英ウエハ（厚さ0.515 mm）に、白金からなる作用極（面積5 mm<sup>2</sup>）と対極（面積5 mm<sup>2</sup>）、銀／塩化銀からなる参照極（面積1 mm<sup>2</sup>）を一組とした82組の電極チップを図3に示すように製作した。一組に切り分けたとき電極チップサイズは10 mm×6 mmである。次にこれを150 mMの塩化ナトリウムを含む6 M尿素溶液中に浸漬し、参照極に対し作用極に0.7 V、10分間印加した。実際には図3に示すように、作用極はすべて結線され、円周につながっている。従って、円周部分と参照極を電気化学測定装置に接続し、電位を印加した。このようにして作用極上に尿素層を形成した。

### 【0105】

つづいて1 v/v%  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液をスピンコートし、40℃の窒素雰囲気下で1時間乾燥させ、結合層を形成した。

### 【0106】

次に、5 %のナフィオン溶液をスピンコートし40℃の窒素雰囲気下で1時間乾燥させ、そしてグルコース酸化酵素を含み、かつ1 v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5 w/v%アルブミン溶液をスピンコートして、固定化酵素層を形成した。

### 【0107】

次に、溶媒として5 v/v%のエタノールを含み、以下の（a）～（g）のカップリング剤を0.1 v/v%含む水溶液を調製した。

- （a） $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン
- （b） $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシラン
- （c）N-フェニル- $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシラン
- （d） $\gamma$ -クロロプロピルトリメトキシシラン
- （e） $\gamma$ -メルカプトプロピルトリメトキシシラン

(f) 3-イソシアネートプロピルトリエシキシラン

(g) 3-アクリロキシプロピルトリメトキシシラン水溶液

この水溶液をそれぞれスピンコートし、40℃の窒素雰囲気下で1時間乾燥させて密着層を形成した。

#### 【0108】

その後、パーフルオロヘキサンを用いて0.3重量%に調整したポリメタクリル酸1H, 1H-パーフルオロオクチル溶液を順次スピンコートしてポリメタクリル酸1H, 1H-パーフルオロオクチルからなる制限透過層を形成し、酵素電極ウエハを作製した。

#### 【0109】

最後にガラススクライブ装置でウエハをダイシングし、酵素電極を得た。このうち任意の5個を選択し、それぞれフレキシブル基板とワイヤーボンディングで結線した後、防水処理を施した。

#### 【0110】

以上のようにして製作した酵素電極を、150 mMの塩化ナトリウムを含む pH 7 の T E S (エヌ・トリス (ハイドロキシメチル)・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド) 緩衝液中に浸漬して保存し、この緩衝液を含む 0 から 2000 mg/dl グルコース溶液に対するセンサ出力である電流値を測定し検量線を作成した。その結果を図 17 に示す。s1 から s7 は、順に、 $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン、 $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシラン、N-フェニル- $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -クロロプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -メルカプトプロピルトリメトキシシラン、3-イソシアネートプロピルトリエシキシラン、および 3-アクリロキシプロピルトリメトキシシランに対応するものである。示されている検量線は 5 個のセンサの平均値をプロットしたものである。電流値および直線性に若干の違いがあるが、どれも、低濃度のグルコースに対しても十分な電流値が得られた。従って、低濃度のグルコースに対しても正確に測定できる酵素電極の作製が可能であることがわかった。

#### 【0111】

#### 実施例 9

## 【0112】

まず、日本電気硝子（株）社製の4インチの石英ウエハ（厚さ0.515 mm）に、白金からなる作用極（面積5 mm<sup>2</sup>）と対極（面積5 mm<sup>2</sup>）、銀／塩化銀からなる参照極（面積1 mm<sup>2</sup>）を一組とした82組の電極チップを図3に示すように製作した。一組に切り分けたとき電極チップサイズは10 mm×6 mmである。次にこれを150 mMの塩化ナトリウムを含む6 M尿素溶液中に浸漬し、参照極に対し作用極に0.7 V、10分間印加した。実際には図3に示すように、作用極はすべて結線され、円周につながっている。従って、円周部分と参照極を電気化学測定装置に接続し、電位を印加した。このようにして作用極上に尿素層を形成した。

## 【0113】

つづいて1 v/v%  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液をスピンコートし、40℃の窒素雰囲気下で1時間乾燥させ、結合層を形成した。

## 【0114】

次に、5%のナフィオン溶液をスピンコートし40℃の窒素雰囲気下で1時間乾燥させ、そしてグルコース酸化酵素を含み、かつ1 v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5 w/v%アルブミン溶液をスピンコートして、固定化酵素層を形成した。

## 【0115】

次に溶媒として5 v/v%のエタノール、メタノール、酢酸エチル、およびコントロールとして純水を含む0.1 v/v%の $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液をそれぞれスピンコートし、40℃の窒素雰囲気下で1時間乾燥させて密着層を形成した。

## 【0116】

その後、パーフルオロヘキサンを用いて0.3重量%に調整したポリメタクリル酸1H, 1H-パーフルオロオクチル溶液を順次スピンコートしてポリメタクリル酸1H, 1H-パーフルオロオクチルからなる制限透過層を形成し、酵素電極ウエハを作製した。

## 【0117】

最後にガラススクライブ装置でウエハをダイシングし、酵素電極を得た。このうち任意の 5 個を選択し、それぞれフレキシブル基板とワイヤーボンディングで結線した後、防水処理を施した。

#### 【0 1 1 8】

以上のようにして製作した酵素電極を、1 5 0 mM の塩化ナトリウムを含む pH 7 の T E S (エヌ・トリス (ハイドロキシメチル) ・メチル・2 - アミノエタンサルフォニックアシッド) 緩衝液中に浸漬して保存し、この緩衝液を含む 0 から 2 0 0 0 m g / d l グルコース溶液に対するセンサ出力である電流値を測定し検量線を作成した。その結果を図 1 8 に示す。Et、Mt、EA、および W はそれぞれエタノール、メタノール、酢酸エチル、および純水を示している。示されている検量線は 5 個のセンサの平均値をプロットしたものである。純水を除いて、電流値および直線性に関する溶媒間の差はわずかであった。したがって、純水にこれらの有機溶媒を添加する方法が有効であり、上記したいずれの溶媒を用いても問題ないことがわかった。

#### 【0 1 1 9】

##### 実施例 1 0

#### 【0 1 2 0】

まず、日本電気硝子 (株) 社製の 4 インチの石英ウエハ (厚さ 0.515 mm) に、白金からなる作用極 (面積 5 mm<sup>2</sup>) と対極 (面積 5 mm<sup>2</sup>)、銀 / 塩化銀からなる参照極 (面積 1 mm<sup>2</sup>) を一組とした 82 組の電極チップを図 3 に示すように製作した。一組に切り分けたとき電極チップサイズは 1 0 mm × 6 mm である。次にこれを 1 5 0 mM の塩化ナトリウムを含む 6 M 尿素溶液中に浸漬し、参照極に対し作用極に 0. 7 V、1 0 分間印加した。実際には図 3 に示すように、作用極はすべて結線され、円周につながっている。従って、円周部分と参照極を電気化学測定装置に接続し、電位を印加した。このようにして作用極上に尿素層を形成した。

#### 【0 1 2 1】

つづいて 1 v/v%  $\gamma$  - アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液をスピンコートし、40℃ の窒素雰囲気下で 1 時間乾燥させ、結合層を形成した。

## 【0122】

次に、5 %のナフィオン溶液をスピンコートし40℃の窒素雰囲気下で1時間乾燥させ、そしてグルコース酸化酵素を含み、かつ1 v/v%のグルタルアルデヒドを含む22.5 w/v%アルブミン溶液をスピンコートして、固定化酵素層を形成した。

## 【0123】

次に溶媒として5 v/v%のエタノールを含む0.1 v/v%の $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液をスピンコートし、40℃の窒素雰囲気下で1時間乾燥させて密着層を形成した。

## 【0124】

その後、パーフルオロヘキサンを用いて0.3重量%に調整したポリメタクリル酸1H, 1H-パーフルオロオクチル溶液を順次スピンコートしてポリメタクリル酸1H, 1H-パーフルオロオクチルからなる制限透過層を形成し、酵素電極ウエハを作製した。比較として密着層のみを形成していない酵素電極ウエハも同様に作製した。

## 【0125】

最後にガラススクライブ装置でウエハをダイシングし、酵素電極を得た。このうち任意の5個を選択し、それぞれフレキシブル基板とワイヤーボンディングで結線した後、防水処理を施した。

## 【0126】

以上のようにして製作した酵素電極を、150 mMの塩化ナトリウムを含むpH 7のTES（エヌ・トリス（ハイドロキシメチル）・メチル・2-アミノエタンサルフォニックアシッド）緩衝液中に浸漬して保存し、この緩衝液を含む0から2000 mg/dlグルコース溶液に対するセンサ出力である電流値を測定し検量線を作成した。そして、良品の酵素電極を選択し、歩留まりを以下の計算式に基づいて算出した。

計算式 : 歩留まり (%) = 良品 / 合計 × 100

ただし、良品の酵素電極とは、2000 mg/dlグルコースに対する出力が30 nA以上150 nA未満、検量線の直線性については、500mg/dlでの出力が2000mg/dlでの出力

の  $1/4 \pm 30\%$  以内のものとした。

表3に密着層のないセンサ出力、表4に密着層のあるセンサ出力をそれぞれ示す。表中のアルファベットおよび数字の組み合わせは基板面内の位置を示す。たとえば、「A」と「3」の組み合わせの示す位置のセンサ出力は、「43.6」である。そして、密着層が形成されていない酵素電極ウエハの歩留まりは約32% (26/82)、密着層が形成された酵素電極ウエハの歩留まりは約85% (70/82) であった。以上の結果から、大量生産プロセスにおいて、密着層が歩留まり向上に有効に機能することが示された。

【0127】

【表3】

グルコース2000mg/dlでの出力: 基板面内分布											(nA)
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	195	10.0	4.0	69.3	20.5	35.5	20.8	4.3	52.4		
2	29.5	26.4	10.3	64.5	15.4	56.3	11.2	10.1	34.0	13.0	
3	43.6	43.6	9.4	17.2	49.5	37.2	4.8	3.0	16.3	19.8	17
4	69.7	5.0	59.4	15.1	13.6	13.0	25.8	12.1	5.6	32.0	4.2
5	44.7	44.7	26.0	25.2	17.3	35.5	18.7	4.2	5.5	9.8	32.9
6	65.6	10	37.1	9.2	19.1	42.9	34.6	9.8	4.3	9.9	56.3
7	99.3	25.7	9.5	16.9	13.0	19.4	200	9.7	11.2	25.1	
8	8.0	10.0	6.0	4.0	60.4	33.4	13.6	9.9	30.7		

【0128】

【表4】

グルコース2000mg/dlでの出力: 基板面内分布											(nA)
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	44	46.6	46.7	70.2	44.1	33.3	20.1	39.1	50.0		
2	30.1	26.1	46.1	65.1	12.9	59.3	10.0	11.9	44.1	33.4	
3	44.1	46.0	43.1	99.9	49.8	39.2	77.1	99.0	32.0	44.1	32
4	72.0	99.9	65.4	39.7	11.1	11.9	53.0	43.0	60.4	32.0	52.1
5	47.0	45.9	25.7	77.7	43.9	45.6	44.4	35.1	64.5	52.4	32.9
6	69.2	64	40.1	37.1	18.4	43.9	40.0	99.0	69.7	9.9	56.3
7	99.7	98.9	44.1	15.4	38.7	18.9	46	43.0	33.4	69.7	
8	39.4	70.0	39.4	43.3	62.7	35.4	34.4	52.4	34.6		

【0129】

**【発明の効果】**

以上説明したように本発明に係る酵素電極は、固定化酵素層の上部にシラン含有化合物を含む密着層を備え、その上面に接してフッ素含有ポリマーを含む制限透過層が形成されている。このため、制限透過層とその下地層（たとえば固定化酵素層）との間の密着性が良好で、製造安定性に優れた高性能の酵素電極が得られる。

**【0130】**

また、本発明に係る酵素電極の製造方法によれば、従来にない高い生産性で高品質の酵素電極を作製することができる。

**【図面の簡単な説明】****【図1】**

本発明に係る酵素電極の断面図である。

**【図2】**

本発明に係る酵素電極の断面図である。

**【図3】**

本発明に係る酵素電極の製造方法を説明するための図である。

**【図4】**

本発明に係る酵素電極を示す図である。

**【図5】**

従来の酵素電極の断面図である。

**【図6】**

本発明に係る酵素電極を具備するバイオセンサを示す図である。

**【図7】**

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

**【図8】**

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

**【図9】**

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

**【図10】**

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

【図 1 1】

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

【図 1 2】

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

【図 1 3】

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

【図 1 4】

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

【図 1 5】

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

【図 1 6】

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

【図 1 7】

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

【図 1 8】

実施例におけるセンサ評価結果を示す図である。

【図 1 9】

チップ単位で酵素電極を作製する製造方法の工程を示す図である。

【図 2 0】

チップ単位で酵素電極を作製する製造方法の工程を示す図である。

【符号の説明】

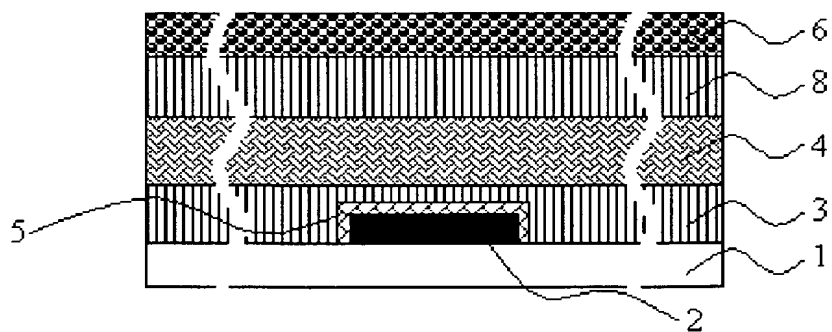
- 1 絶縁基板
- 2 電極
- 3 結合層
- 4 固定化酵素層
- 5 電極保護層
- 6 制限透過層
- 7 イオン交換樹脂層



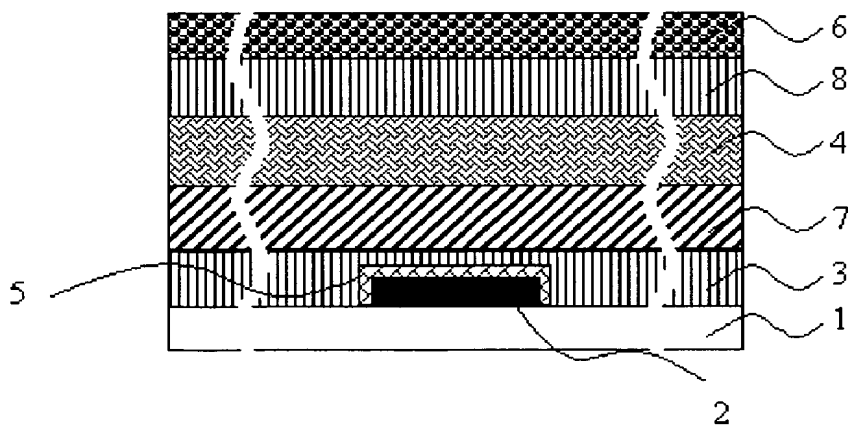
- 8 密着層
- 9 作用極
- 1 0 対極
- 1 1 参照極
- 1 2 ウエハ
- 1 5 温度センサ
- 1 7 作用極
- 1 8 対極
- 1 9 参照極
- 3 0 基板
- 3 1 電極
- 3 2 固定化酵素層
- 3 3 接着層
- 3 4 高分子層
- 3 5 制限透過層
- 3 6 接着層
- 3 7 保護層

【書類名】 図面

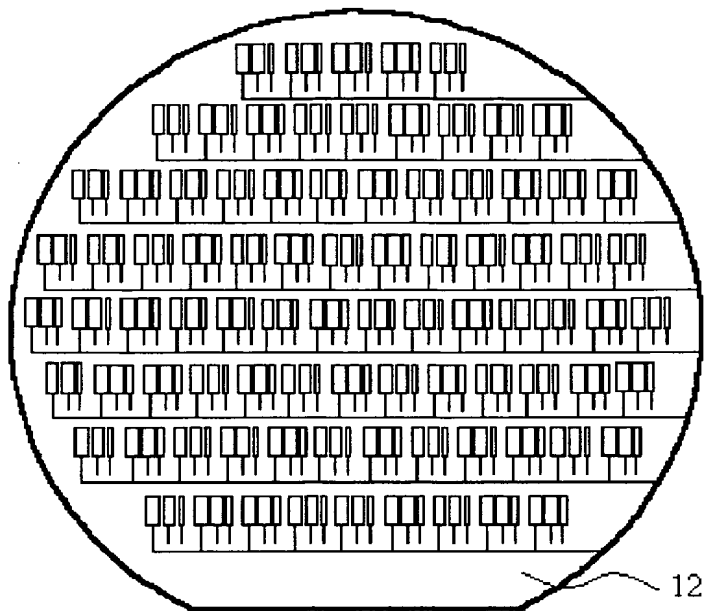
【図 1】



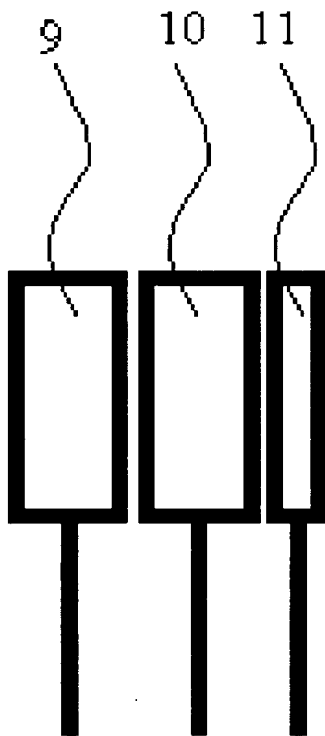
【図 2】



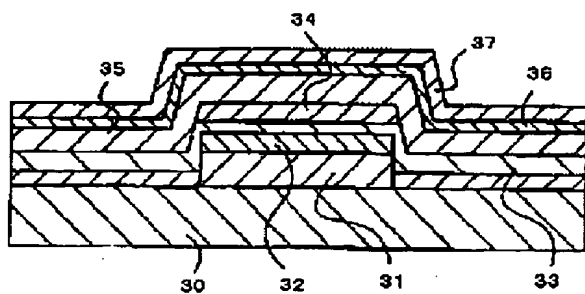
【図 3】



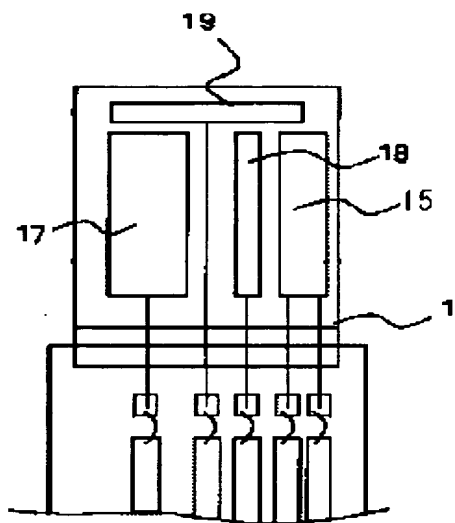
【図 4】



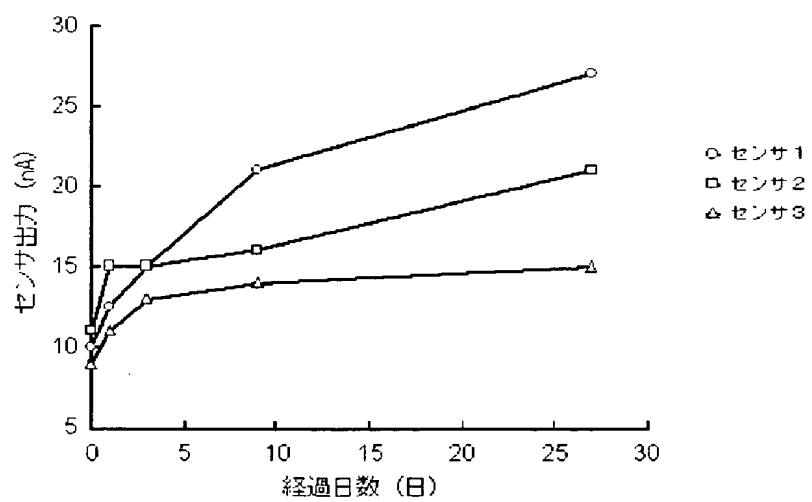
【図 5】



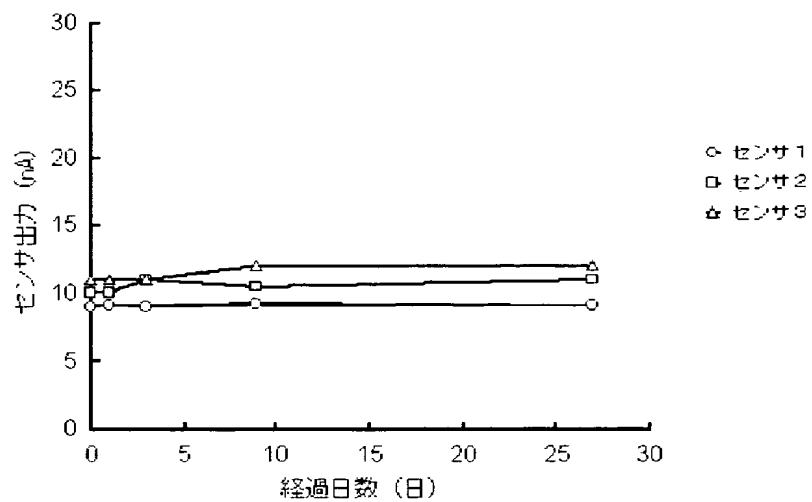
【図 6】



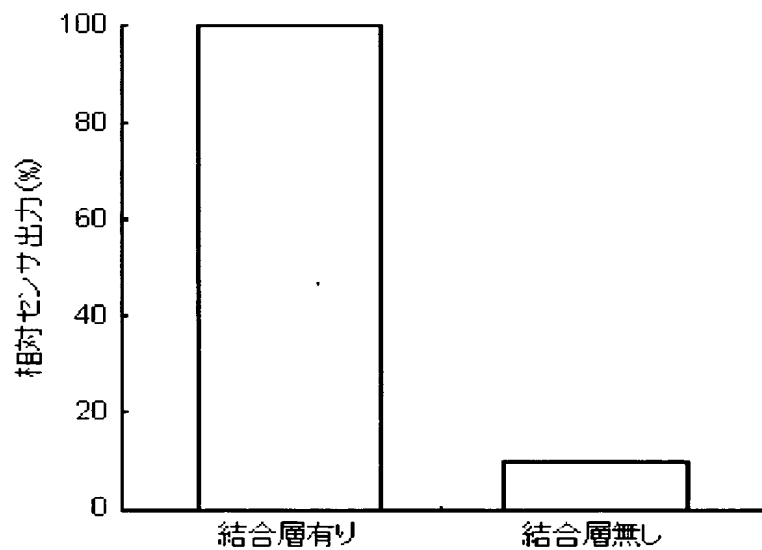
【図 7】



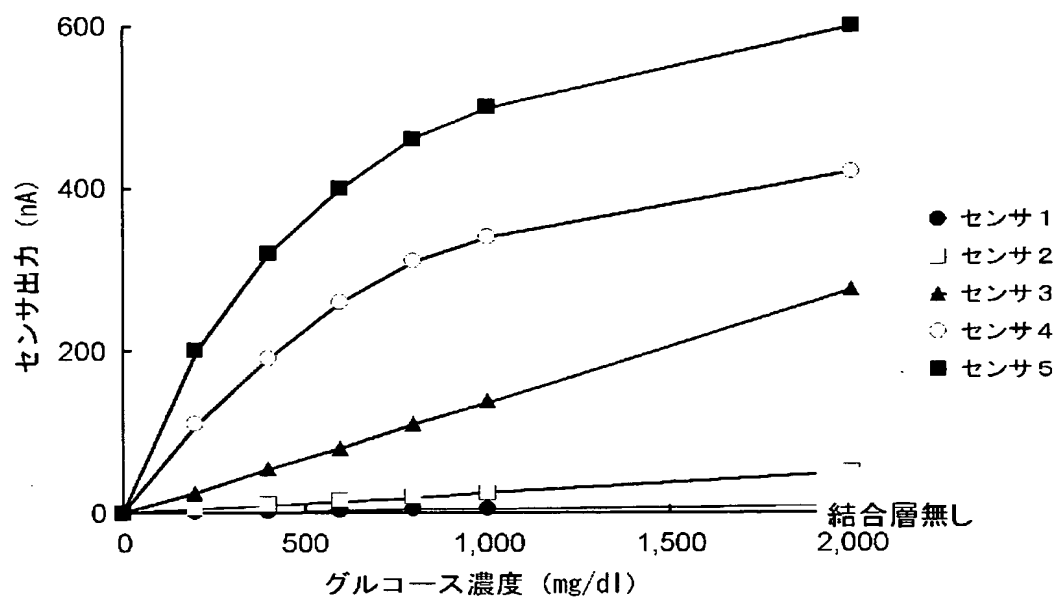
【図 8】



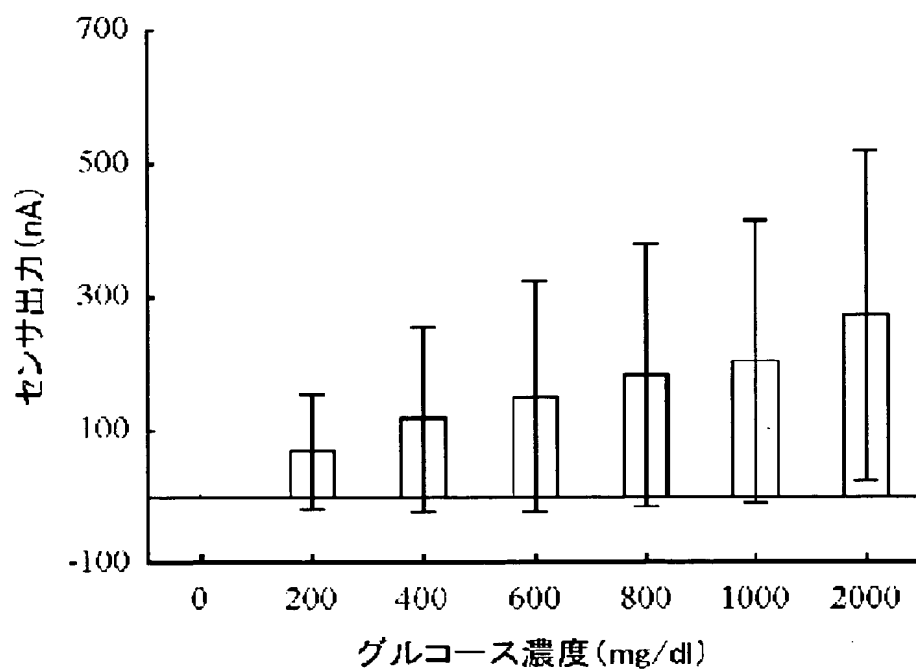
【図 9】



【図 10】

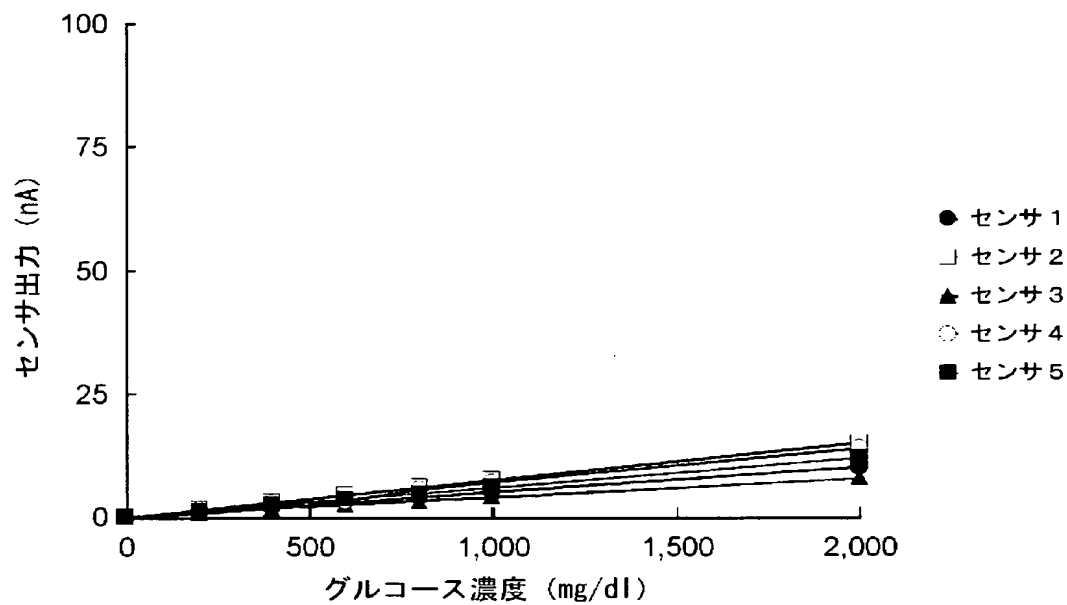


(a)

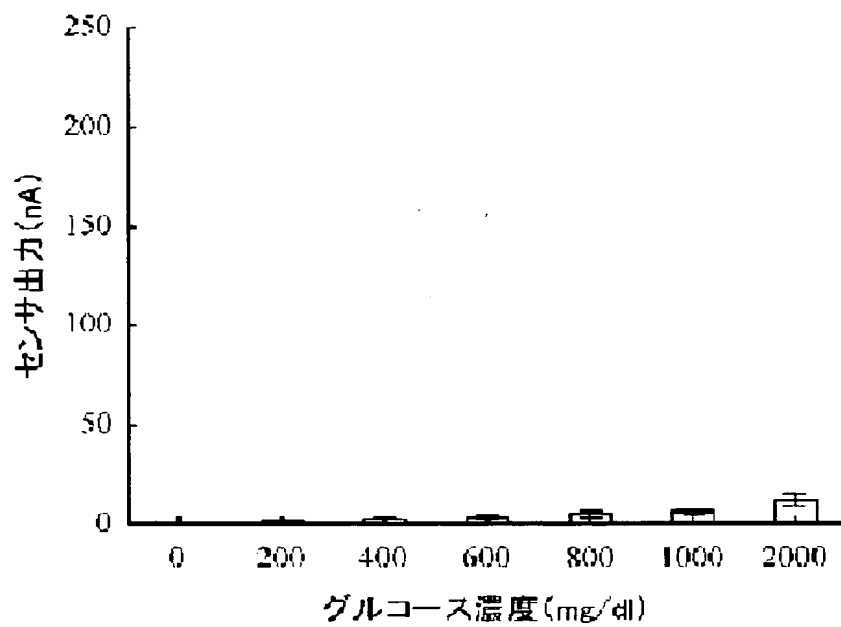


(b)

【図 11】

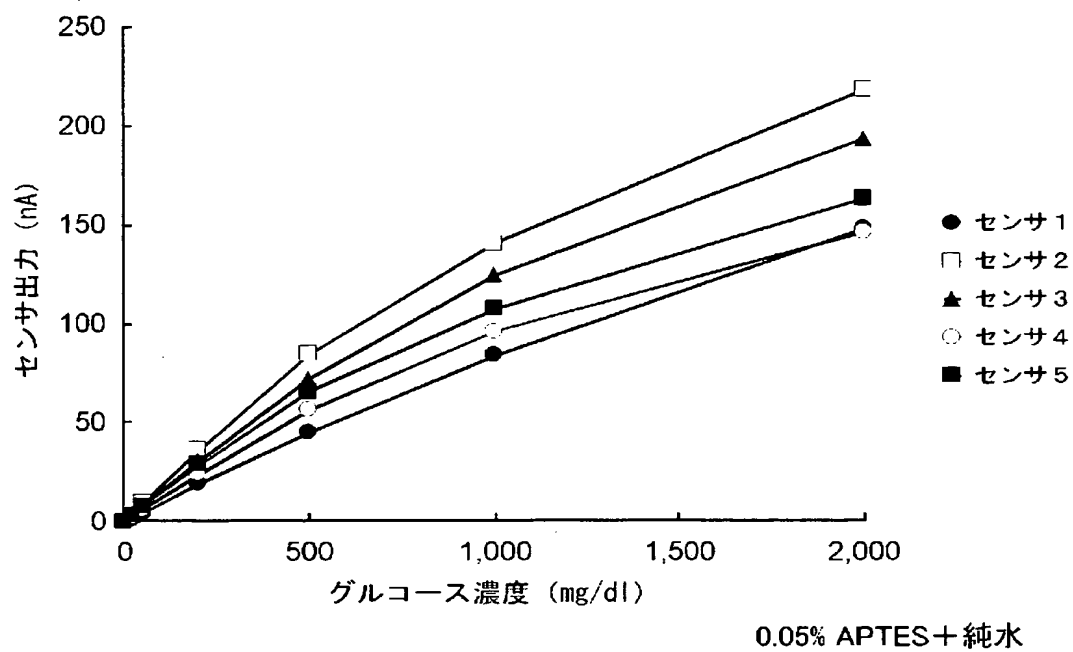


(a)

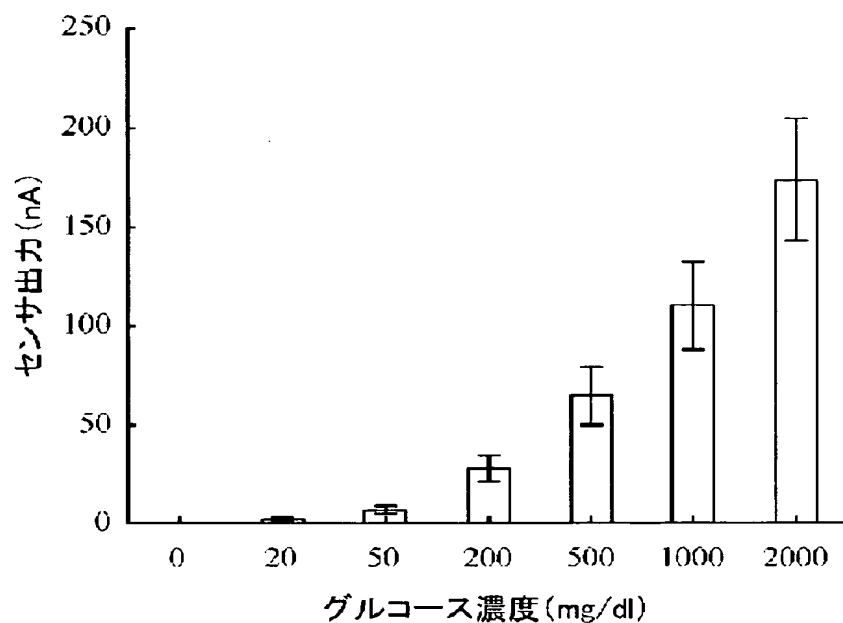


(b)

【図 12】



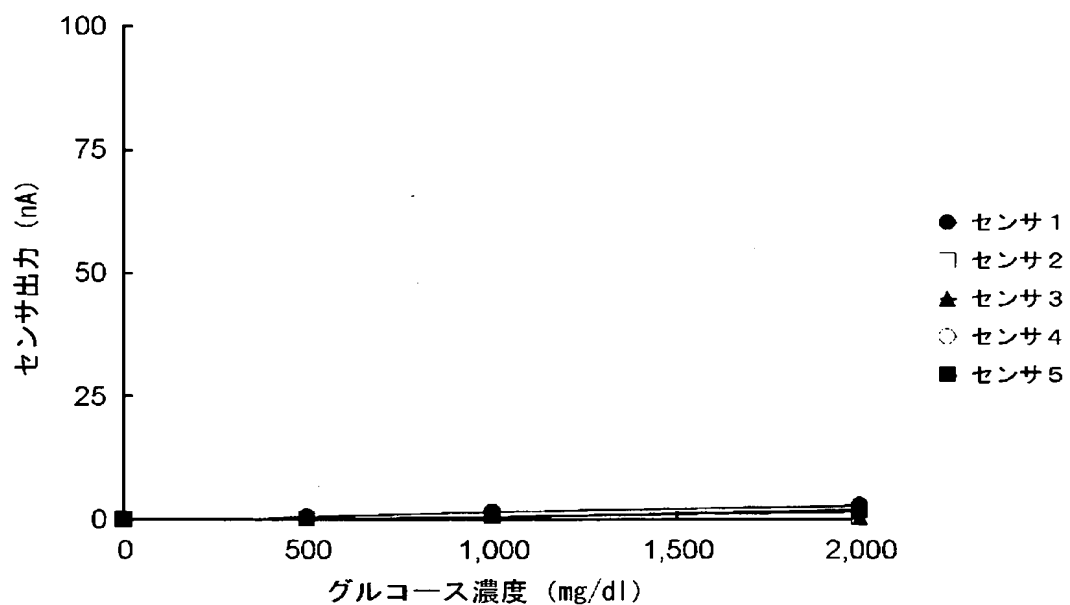
(a)



(b)

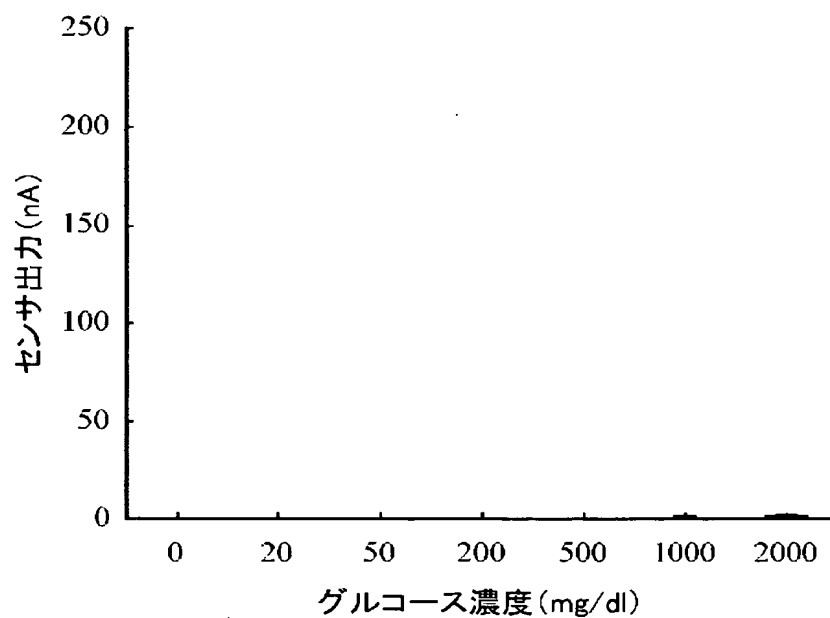


【図 13】



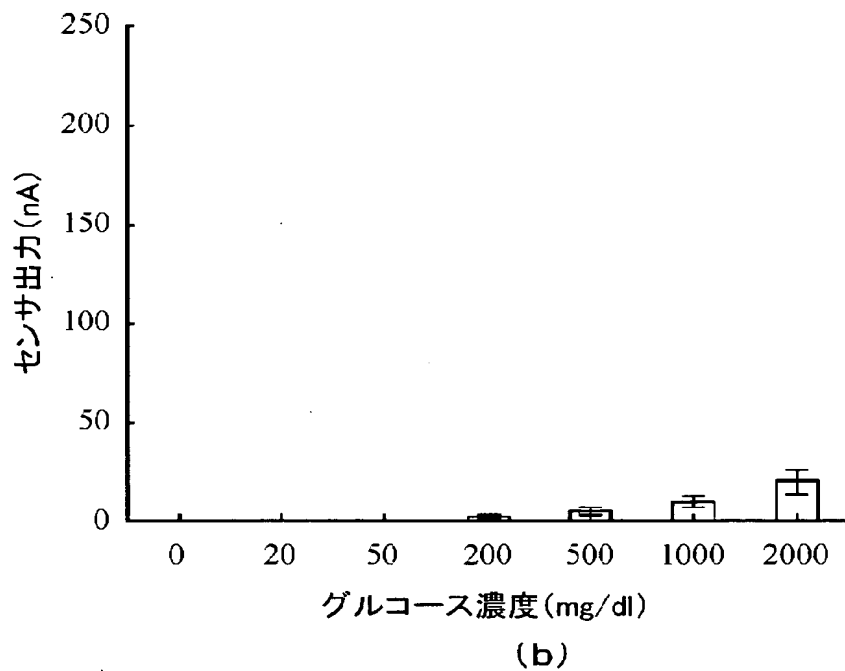
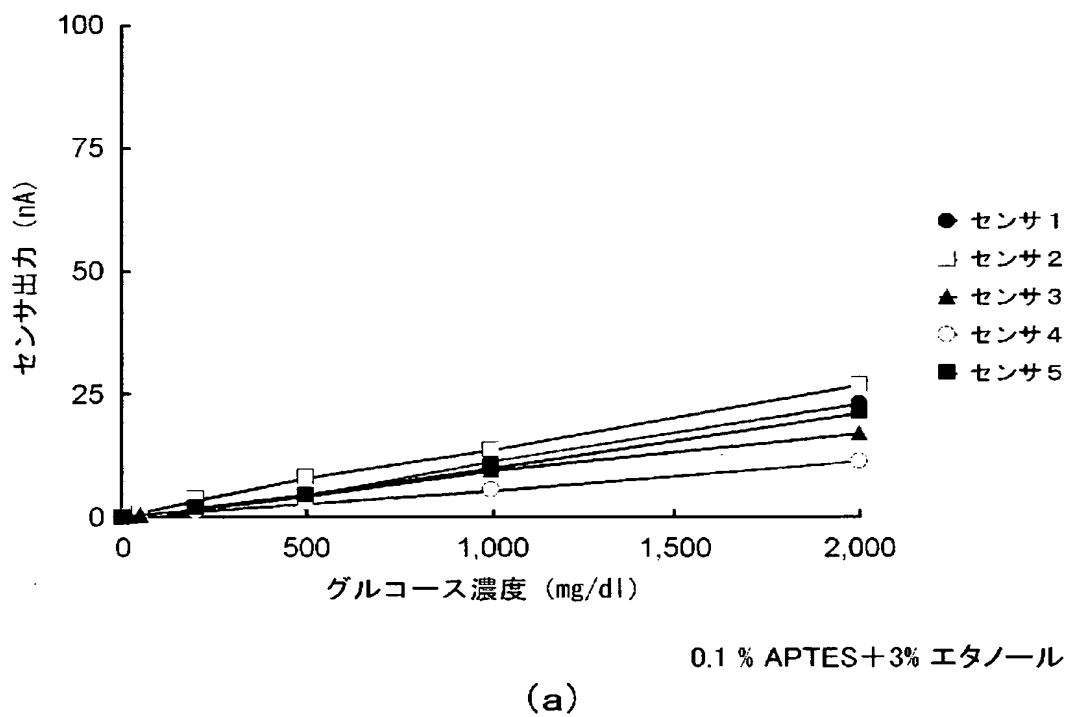
0.2 % APTES+純水

(a)

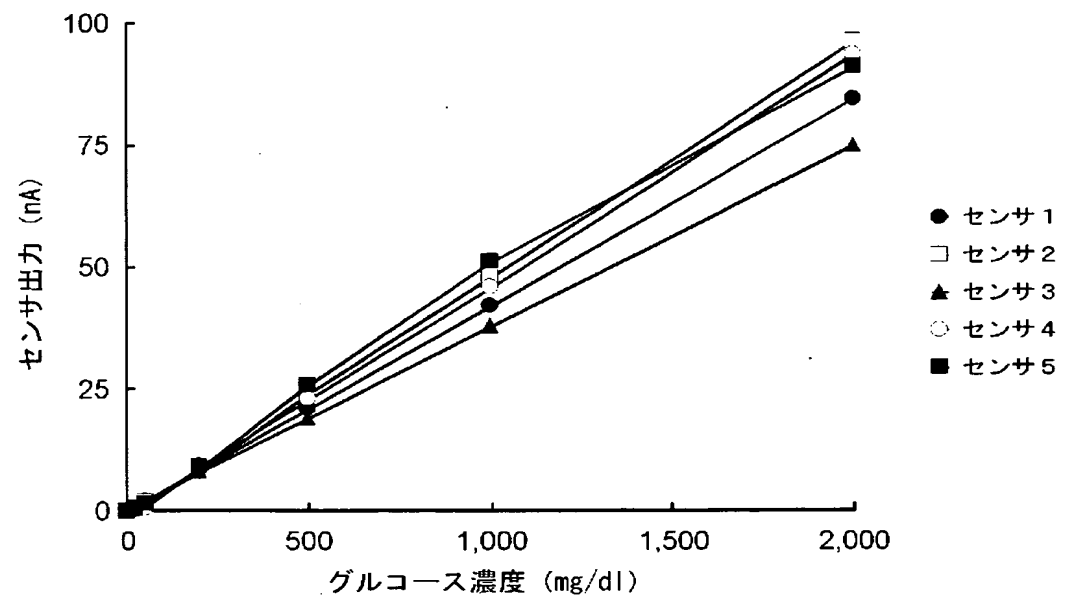


(b)

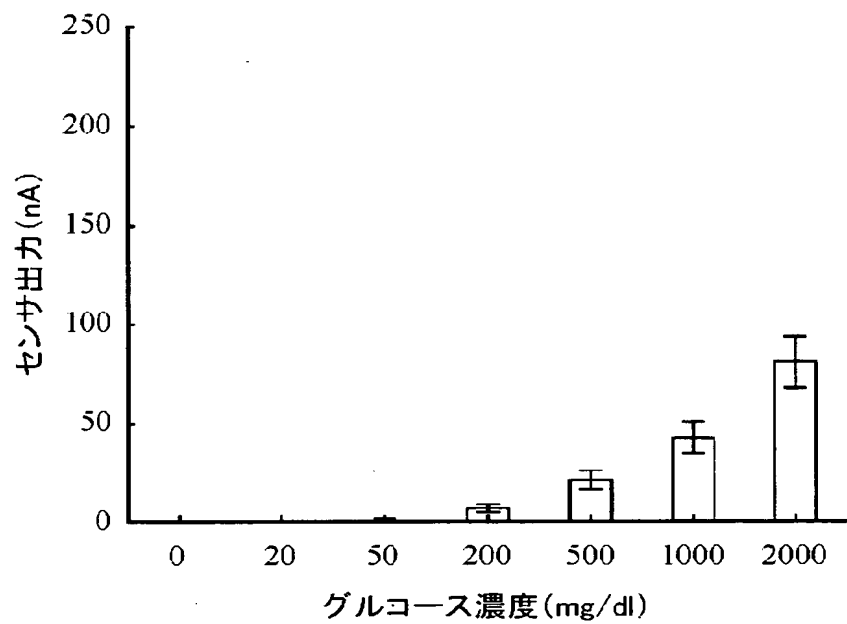
【図 14】



【図 15】

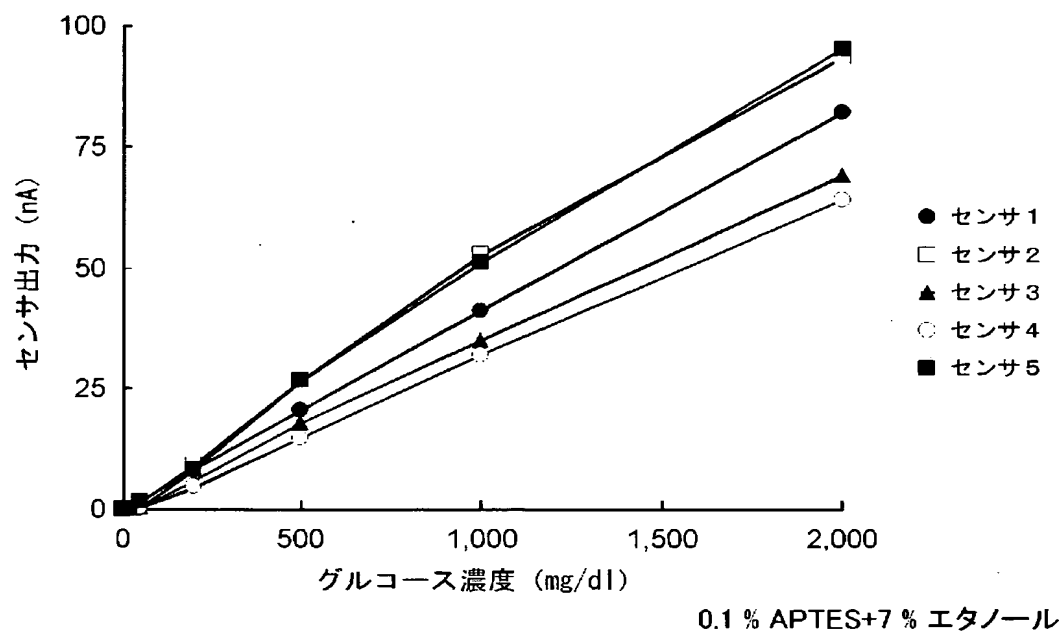


(a)

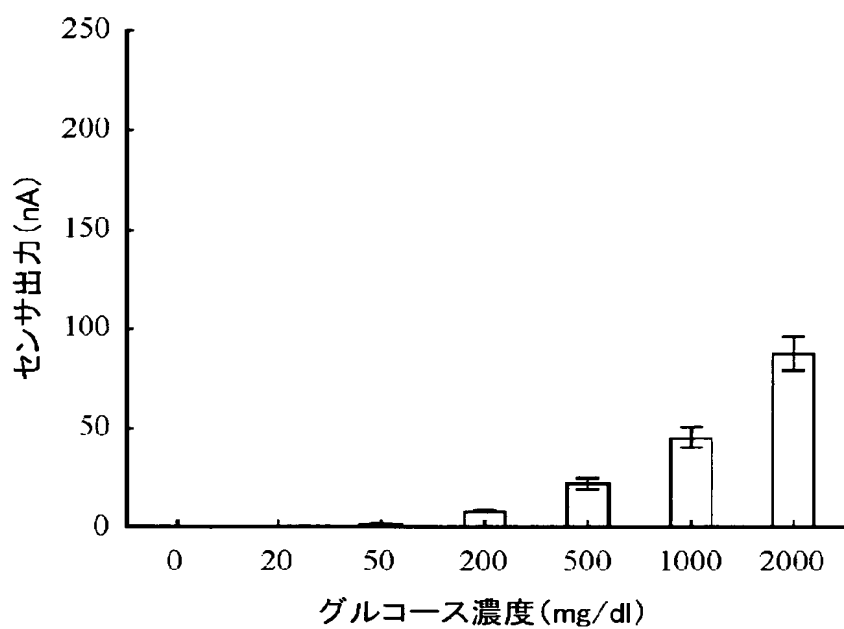


(b)

【図 16】

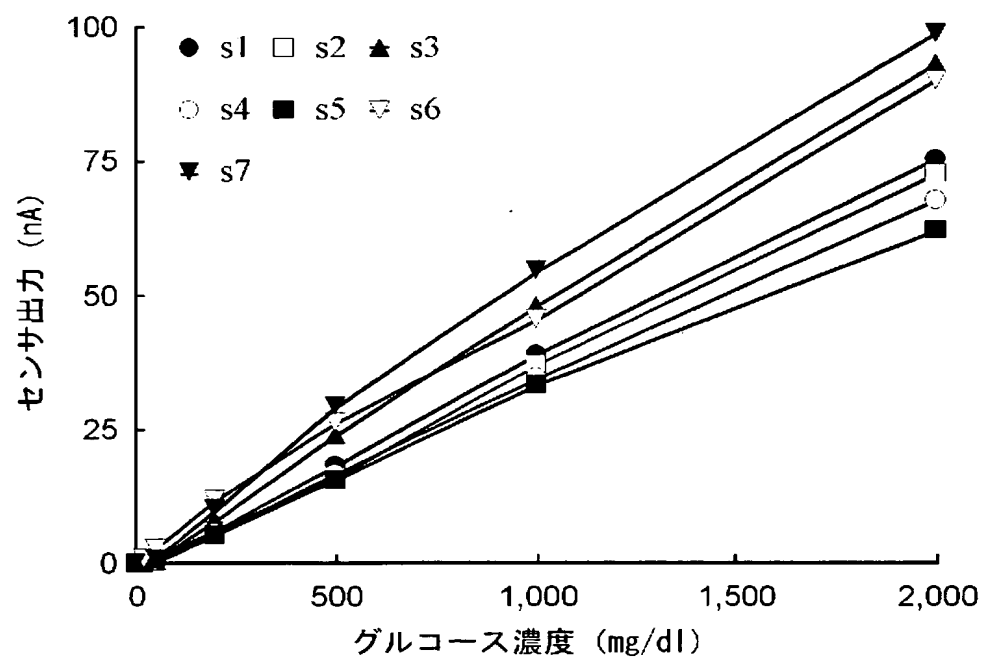


(a)

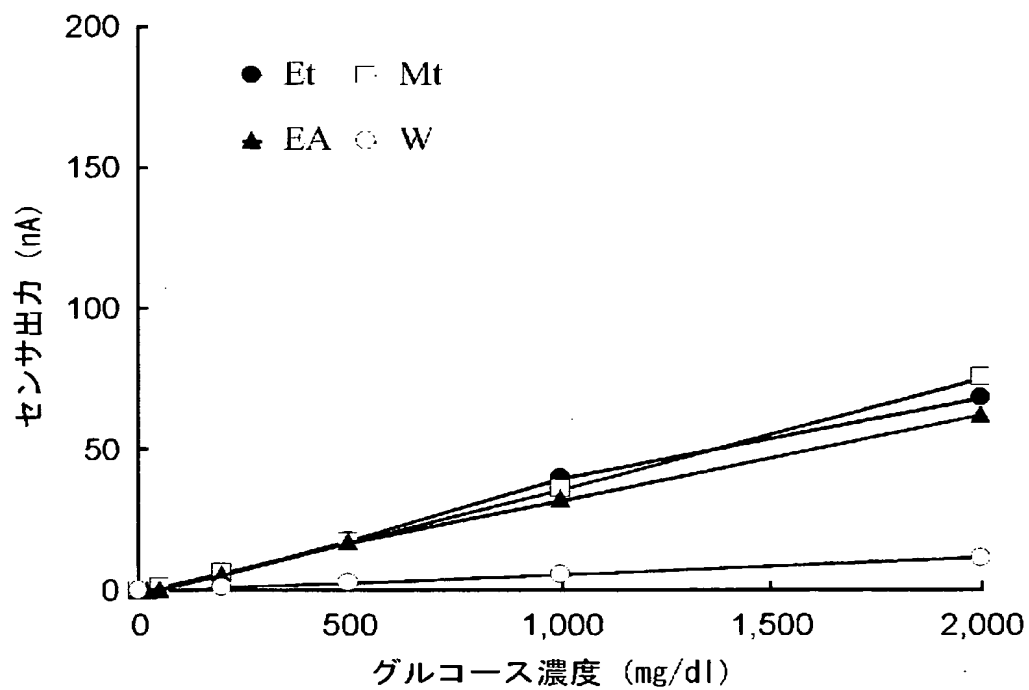


(b)

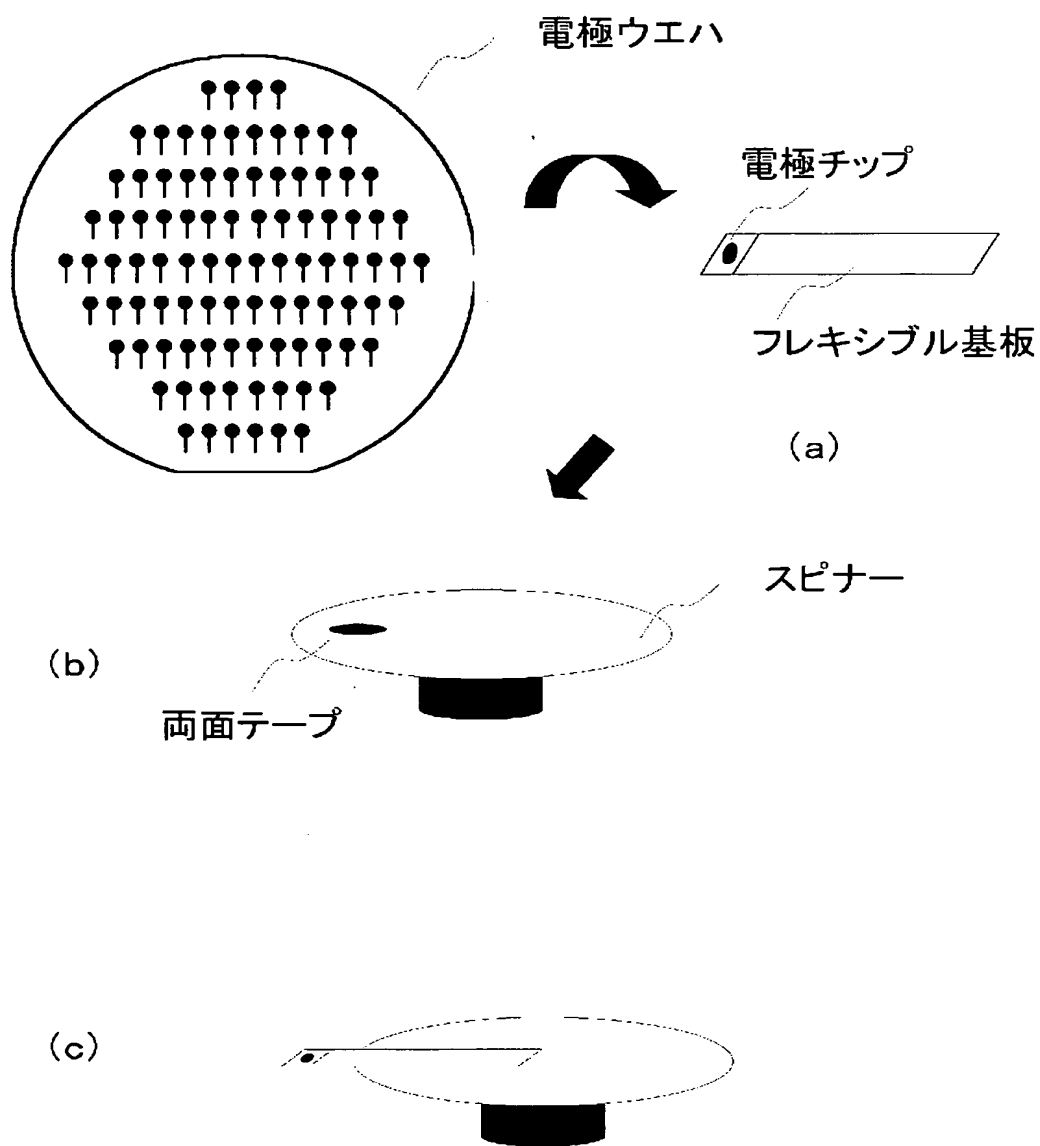
【図 17】



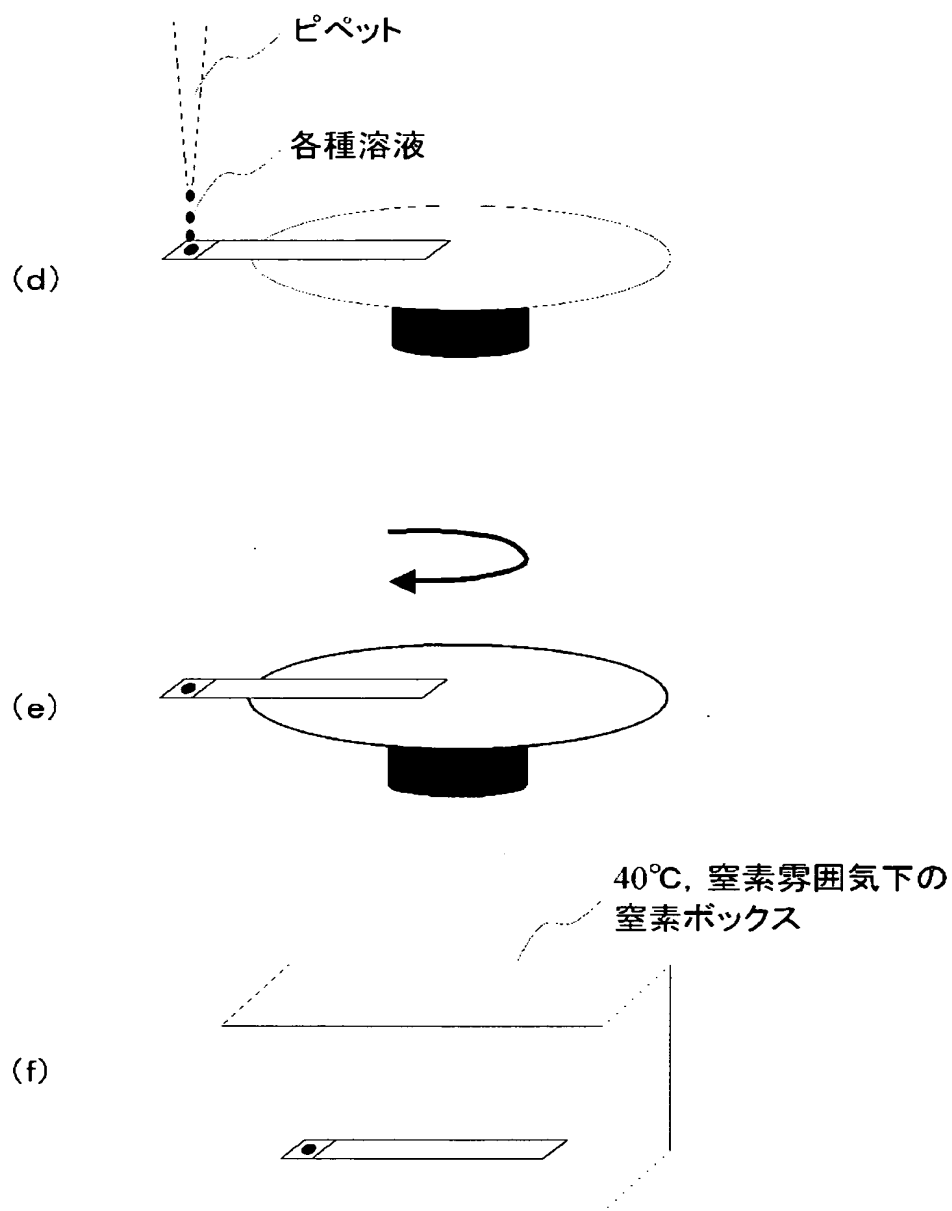
【図 18】



【図 19】



【図 20】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 広範囲の使用条件下において使用でき、長期使用に対する耐久性が良好で、しかも、生産性に優れた酵素電極を提供する。

【解決手段】 絶縁基板 1 上に作用極として機能する電極 2 を設け、その上面を被覆するように尿素化合物から主としてなる電極保護層 5 を形成し、その上に結合層 3、固定化酵素層 4 を積層する。その上に  $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシランにより構成された密着層 8 を介してポリカルボン酸樹脂のフルオロアルコールエステルを主成分とする制限透過層 6 を形成する。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 1 - 2 2 3 6 1 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 4 2 3 7 ]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 2 9 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都港区芝五丁目 7 番 1 号
氏 名	日本電気株式会社